

Process for the preparation of didemnine A

Bibliographic data

Patent number: ES2102322
Publication date: 1997-07-16
Inventor: ALBERICIO PALOMERA FERNANDO (ES); GIRALT LLEDO ERNEST (ES); LLOYUD-WILLIAMS PAUL (GB)
Applicant: PHARMA MAR SA (ES)
Classification:
- international: C07K11/00
- european:
Application number: ES19950001411 19950713
Priority number(s): ES19950001411 19950713

Abstract of ES2102322

Process for the preparation of didemnine A Comprises: (a) coupling the units Z-N(Me)-O(Me)-Tyr-O- [Boc-Thr]-OH and H-Ist-Hip-Leu-Pro-OBzl. HCl in the presence of HBTU and DIEA, (b) simultaneously deprotecting the N- and C-terminal ends of the product obtained, (c) cyclizing the product from stage (b) using the coupling agent HBTU in the presence of HOBT and DIEA to produce a macrocycle with the terminal N of the Thr protected, (d) deprotecting the said group and coupling the macrocycle with Boc-(R)-NMe-Leu-OH to produce Boc- didemnine A, (e) reacting the latter product with trifluoroacetic acid to obtain didemnine A. Didemnine A has application as an antitumour, antiviral and immunosuppressive agent.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 102 322**

⑫ Número de solicitud: 9501411

⑬ Int. Cl.⁵: C07K 11/00

⑭

SOLICITUD DE PATENTE

A1

②② Fecha de presentación: 13.07.95

④③ Fecha de publicación de la solicitud: 16.07.97

④③ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.07.97

⑦① Solicitante/s: Pharma Mar, S.A.
C/ de la Calera, nº 3
28760 Tres Cantos, Madrid, ES

⑦② Inventor/es: Giralt Lledo, Ernest;
Albericio Palomera, Fernando;
Lloyd-Williams, Paul;
González Valcárcel, Isabel;
Jou Prat, Gemma;
Gómez González, Andrés y
Manzanares Secades, Ignacio

⑦④ Agente: Ungría López, Javier

⑤④ Título: Procedimiento de preparación de didemnina A.

⑤⑦ Resumen:

Procedimiento de preparación de didemnina A.
Comprende: (a) acoplar las unidades Z-N(Me)-
O(Me)-Tyr-O-[Boc-Thr]-OH y H-Ist-Hip-Leu-Pro-
OBzl. HCl en presencia de HBTU y DIEA; (b)
desproteger simultáneamente los extremos N- y C-
terminal del producto obtenido; (c) ciclar el produc-
to de la etapa (b) empleando el acoplante HBTU
y en presencia de HOBT y DIEA, para producir un
macrociclo con el N-terminal de la Thr protegido;
(d) desproteger dicho grupo y acoplar el macroci-
clo con Boc-(R)-NMe-Leu-OH para producir la Boc-
didemnina A; (e) hacer reaccionar este último pro-
ducto con ácido trifluoracético para obtener la di-
demnina A.

La didemnina A tiene aplicación como agente anti-
tumoral, antiviral e inmunosupresor.

ES 2 102 322 A1

DESCRIPCION

Procedimiento de preparación de didemnina A.

5 Campo técnico de la invención

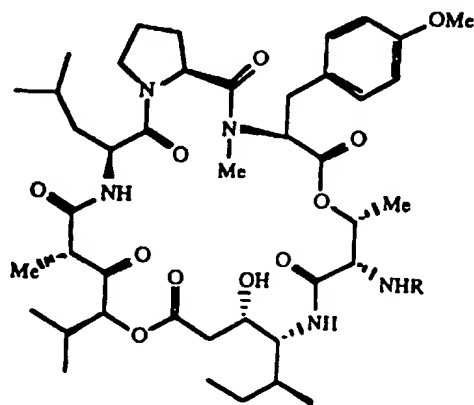
La presente invención se encuadra dentro del campo técnico de los ciclodepsipéptidos.

Más concretamente la presente invención se refiere a la obtención de didemninas, que son una clase
10 de ciclodepsipéptidos con actividad antitumoral, antiviral e inmunosupresora.

Estado de la técnica anterior a la invención

Las didemninas son una clase de ciclodepsipéptidos aislados por Rinehart [(1) Rinehart, K.; Gloer, J.;
15 Cook, J.J. Am. Chem. Soc. 1981, 103, 1857-1859. (2) Rinehart, K.L.; Cook, J.C.; Pandey, R.C.; Gaudioso, L.A.; Meng, H.; Moore, M.L.; Gloer, J.B.; Wilson, G.R.; Gutowsky, R.E.; Zierath, P.D.; Shield, L.S. Pure. Appl. Chem. 1982, 54, 2409-2424] en 1981, de un tunicado del Caribe de la familia Dideniidae, que poseen actividad antitumoral, antiviral e inmunosupresora. Esta familia de ciclodepsipéptidos
20 tiene numerosos miembros como son las didemninas A,B,C,D y E y las nordidemninas, aisladas de *Trididemnum solidum* (1) y de *Trididemnum cyanophorum* [(1) y (3) Castro, B.; Jouin, P.; Cavé, A.; Dufour, M.; Banaigs, B.; Francisco, C. En "Peptides. Chemistry and Biology. Proceeding of the 10th American Peptides Symposium, (Marshall, G., ed.), ESCOM, Leiden, 1987, pp. 656-657]. Mas recientemente se
han aislado las didemninas G, X, Y de *Trididemnum solidum* [(4) Rinehart, K.; Sakai, R.; Stroh, J.U.S. Patente 4,948,791, 1990. (5) Rinehart, K.; Holt, T.; Fregeau, N.; Keifer, P.A.J. Nat. Prod. 1990, 53,
25 771-792], la didemnina H de *Trididemnum cyanophorum* [(6) Boulanger, A.; Abou -Mansour, E.; Badre, A.; Banaigs, B.; Combaut, G.; Francisco, C. Tetrahedron Lett. 1994, 35, 4345-4348] y la dehidrodidemnina B de *Aplydium albicans* [(7) Schmitz, F.J.; Yasumumoto, T.J.J. Nat. Prod. 1991, 54, 1469-1490].

Las didemninas poseen un macrociclo común que las caracteriza y se diferencian por la cadena lateral
30 unida al esqueleto del mismo por el extremo amino de treonina. Dicho macrociclo es de 23 miembros y posee 10 centros estereogénicos. Está constituido por seis unidades, tres de ellas son aminoácidos usuales: (S)-treonina, (S)-prolina y (S)-leucina. Contiene un α -aminoácido modificado (S)-N(Me)-O(Me)-Tyr, un β -aminoácido el ácido, (3S, 4R, 5S)-3-hidroxi-4-amino-metilheptanóico [isostatina (1st)] y el ácido (2S, 4S) α -(α -hidroxisovaleryl) propiónico (Hip). El primer aminoácido de la cadena lateral, (R)-N (Me)-Leu,
35 es también común a todas ellas. En la fórmula (1.1) se representan algunos de estos compuestos:



1.1.

Didemnina	R
5 1a 1b A 1c B 1d C 10 1e D 1f E 1g G 1h H 1i X 15 1j Y 1k DDB	H H-(R)-N(Me)-Leu- Lac-(S)-Pro-(R)-N(Me)-Leu- Lac-(R)-N(Me)-Leu- (S)-pGlu-(S)-Gln-(S)-Gln-(S)-Gln-Lac-(S)-Pro-(R)-N(Me)-Leu- (S)-pGlu-(S)-Gln-(S)-Gln-Lac-(S)-Pro-(R)-N(Me)-Leu- CHO-(R)-N(Me)-Leu- (S)-pGlu-(S)-Gln-(R)-N(Me)-Leu- n-C ₇ H ₁₅ CH(OH)-CH ₂ CO-[(S)-pGlu] ₃ -Lac-(S)-Pro-(R)-N(Me)-Leu- n-C ₇ H ₁₅ CH(OH)-CH ₂ CO-[(S)-pGlu] ₄ -Lac-(S)-Pro-(R)-N(Me)-Leu- Piruv-(S)-Pro-(R)-N(Me)-Leu-

20 Las didemninas A y B. inhiben la replicación de muchos virus DNA así como de RNA in vitro. También muestran una significativa actividad antiviral frente a otros virus, como por ejemplo: varicella, zoster, citomegalovirus, fiebre amarilla, rinovirus equino, coxsackievirus A21, parainfluenza, encefalomyelitis equina venezolana. Son también efectivos in vivo contra infecciones causadas en ratones por herpes simplex vaginal del tipo 2. La didemnina B es más efectiva que la didemnina A, ya que se consiguen los
 25 mismos efectos con concentraciones de 10 a 100 veces menores. [(8) Chung, H.G.; Davies, B.; Hoth, D.; Suffness, M.; Plowman, J.; Flora, K.; Jones, B. Investigational New Drugs 1986, 4, 279-284]. Mejores resultados se han obtenido con dehidrodidemnina B (DDB), su estructura es muy similar a la de didemnina B, solo se diferencia por contener ácido pirúvico en lugar de ácido láctico. Se ha comprobado [(9) Rinehart, K. L.; Goer, J.B.; Hughes, R.G.; Renis, H.E.; McGovern, J.P.; Swynenberg, E.B. Stringfellow, D.A.; Kwentzel, S.L.; Li, L. H. Science 1981, 212, 933-935; (10) Rinehart, K.L.; Sakai, R.; Holt, T.G.; Fregeau, N.L.; Perun, T. J.; Seigler, D. S.; Wilson, G. R.; Shield, L. S. Pure Appl. Chem. 1990, 62, 1277-1280. (11) Montgomery, D.W.; Zukoski, C.F.; Transplantation 1985, 40, 49-56] que su actividad
 30 antiviral en el caso de los virus herpes simplex coxsackievirus es varias veces mayor que en el caso de la didemnina B.

35 La actividad antitumoral presentada por estos compuestos es especialmente prometedora en el caso de didemnina B y de dehidrodidemnina B. Las pruebas realizadas in vivo indicaron que tanto didemnina B como dehidrodidemnina B muestran una potente actividad antitumoral frente a leucemia P388, melanoma B16, sarcoma M5076. La actividad antitumoral de la didemnina B, se ha probado en células
 40 humanas de tumores de mama, ovario, sarcoma, riñón y mesotelioma obteniendo buenos resultados a bajas concentraciones del orden de 0,01 mg/ml para exposiciones continuas [(9), (10) y (11)].

La didemnina B muestra unas potentes propiedades inmunosupresoras, a muy bajas concentraciones (subnano -gramo/ml), inhibe la blastogénesis de linfocitos murina estimulada por concanavalina A, lipopolisacáridos, y aloantígenos [(8)]. Comparada con ciclosporina A y otras drogas, la didemnina B es
 45 de 100 a 1000 veces más potente [(11) y Hossai, M.B.; Van der Helm, D.; Antel, J.; Sheldrick, G.M.; Sanduja, S.K.; Weinheimel, A.J. Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 1988, 85, 4118-4122]. Por otra parte, también es capaz de suprimir rechazo en transplantes realizados in vivo [(12) Stevens, D.W.; Jensen, R.M.; Stevens, L.E.; Transplant. Proc. 1989, 21, 1139-1140. (13) Yuh, D.D.; Zurcher, R.P.; Carmichael, P.G.; Morris, R.E. Transplant. Proc. 1989, 21, 1141].

Debido a los prometedores resultados tanto in vitro como in vivo, la didemnina B ha sido seleccionada para las pruebas clínicas en las fases I y II como candidata a fármaco para diversos neoplasmas en el
 50 National Cancer Institute. [(14) Dorr, T.A.; Kuhn, J.G.; Phillips, J.; von, H.D. Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 1988, 24, 1699-1706. (15) Jacobs, A.J.; Blessing, J.A.; Munoz, A. Gynecol. Oncol. 1992, 44, 268-270. (16) Shin, D.H.; Holoye, P.Y.; Murphy, W.K.; Forman, A.; Papasozomenos, S.C.; Hong, W.K.; Raber, M. Cancer Chemother. Pharmacol. 1991, 29, 145-149. (17) Stewart, J.A.; Low, J.B.; Roberts, J.D.; Blow, A. Cancer, 1991, 68, 2550-2554].

60 Descripción detallada de la invención

La presente invención, tal y como se indica en su enunciado se refiere a un procedimiento de prepa-

ración de didemnininas, en particular didemnina A.

Concretamente, en esta invención se propone una nueva síntesis de didemnina A y la síntesis de dehidrodidemnina B a partir de ésta. Aunque la síntesis de otros miembros de la familia de las didemnininas está descrita [(10), (18) Schmidt, U.; Kroner, M.; Griesser, H.; Tetrahedron Lett. 1988, 29, 3057-3060; (19) Schmidt, U.; Kroner, M.; Griesser, H.; Tetrahedron Lett. 1988, 29, 4407-4408. (20) Schmidt, U.; Kroner, M.; Griesser, H. Synthesis 1989, 832-835. (21) Schmidt, U.; Kroner, M.; Griesser, H. Synthesis 1991, 294-300. (22) Hamada, Y.; Kondo, Y.; Shibata, M.; Shioiri, T.J. Am.Chem. Soc. 1989, 111, 669-673. (23) Ewing, W.R.; Harris, B.D.; Li, W.R.; Joullie, M.M. Tetrahedron Lett. 1989, 30, 3757-3760. (24) Li, W.R.; Harris, B.D.; Joullie, M.M. J. Am. Chem. Soc. 1990, 112, 7659-7672] la síntesis de la presente invención permite obtener el miembro más activo de las didemnininas mediante una ruta nueva y práctica.

Dicha ruta sintética se basa en el acoplamiento de las unidades Z-N(Me)-O(Me)-Tyr-O-[Boc-Thr]-OH y H-Ist-Hip-Leu-Pro-OBzl.HCl, utilizando HBTU y DIEA, dando lugar a Z-N(Me)-O(Me)-Tyr-[Boc-Thr]-Ist-Hip-Leu-Pro-OBzl, precursor lineal protegido al macrociclo de las didemnininas.

La unidad Z-N(Me)-O(Me)-Tyr-O-[Boc-Thr]-OH se sintetiza a partir de Z-N(Me)-O(Me)-Tyr-OH y Boc-Thr-OSem que se acoplan, por esterificación, con DCC. El tratamiento de éste dipeptido con fluorhídrico acuoso, al 12%, da lugar a Z-N(Me)-O(Me)-Tyr-O-[Boc-Thr]-OH.

La unidad H-Ist-Hip-Leu-Pro-OBzl.HCl se sintetiza a partir de Boc-Leu-OH y H-Pro-OBzl que se acoplan con DCC y HOBt proporcionando Boc-Leu-Pro-OBzl. La desprotección del extremo amino de este dipéptido con ácido trifluoroacético seguido por el acoplamiento con TBDMS-Hip-OH mediante tratamiento con HBTU, HOBt y DIEA proporciona TBDMS-Hip-Leu-Pro-OBzl. El tratamiento de esta molécula con fluoruro de tetrabutilamonio libera el grupo hidroxilo y su esterificación con Boc-Ist(OTBDMS)-OH mediado por DCC conduce a Boc-Ist-Hip-Leu-Pro-OBzl. El tratamiento de esta unidad con clorhídrico en dioxano da lugar a H-Ist-Hip-Leu-Pro-OBzl.HCl.

El acoplamiento entre las unidades Z-N(Me)-O(Me)-Tyr-O-[Boc-Thr]-OH e H-Ist-Hip-Leu-Pro-OBzl.HCl dan lugar a Z-N(Me)-O(Me)-Tyr-[Boc-Thr]-Ist-Hip-Leu-Pro-OBzl. La desprotección simultánea de los extremos N- y C-terminal de esta unidad mediante hidrogenólisis conduce a H-N(Me)-O(Me)-Tyr-[Boc-Thr]-Ist-Hip-Leu-Pro-OH, precursor lineal del macrociclo de las didemnininas, con el N-terminal de la Thr protegido con el grupo Boc. La ciclación de este precursor utilizando el agente acoplante HBTU en presencia de HOBt y DIEA conduce al macrociclo de las didemnininas, en el que el N-terminal de la Thr está protegido con el grupo Boc. La desprotección del grupo amino de Thr mediante tratamiento con ácido trifluoroacético, seguido por el acoplamiento del macrociclo con Boc-(R)-NMe-Leu-OH conduce a Boc-didemnina A, que después del tratamiento con ácido trifluoroacético, y el acoplamiento con la unidad Pir-Pro-OH da lugar a la dehidrodidemnina B.

Modos de realización de la invención

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante el siguiente Ejemplo, el cual no pretende ser limitativos de su alcance.

Ejemplo

Z-N(Me)-O(Me)-Tyr-OH

Se disolvió Z-Tyr-OH (3.48 g, 11 mmol) en THF (50 ml) a temperatura ambiente y con una fuerte agitación se adicionó en pequeñas porciones, KOH en polvo (6.20 g, 110 mmol) e hidrogenosulfato de tetrabutilamonio (0.35 g, 10% en peso). A continuación, se añadió Me₂SO₄ (7 ml, 73.50 mmol) gota a gota durante 15 minutos. Después de 30 minutos, se enfrió la mezcla de reacción a 0°C y se añadió H₂O (60 ml) manteniéndose la agitación durante 5 horas. Seguidamente, se diluyó la mezcla de reacción con Et₂O (100 ml) y después de 15 minutos, se separó la fase acuosa de la etérea. Se hicieron extracciones de la fase etérea con disolución saturada de NaHCO₃ (3 x 25 ml). Se juntaron las fases acuosas, se llevaron a pH 1.5 con disolución 1 M de KHSO₄ y se extrajeron con AcOEt (3 x 50 ml). Finalmente, se combinaron las fases orgánicas, se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se eliminó el disolvente obteniéndose Z-N(Me)-O(Me)-Tyr-OH (3.21 g, 85%) como un aceite que cristalizaba en la nevera. Pf 63°C (lit.²⁴: aceite); [α]_D²⁵ (2.23 c, CHCl₃) (lit.²⁴: [α]_D¹⁸ (c 2.23, CHCl₃)); IR (sólido) 3300-2800, 2700-2500, 1750, 1700, 1650, 1620, 1520, 1480, 1460, 1400, 1330, 1250, 1190, 1150, 1040, 990, 830, 820 cm⁻¹; ¹H RMN (200 MHz, CDCl₃) 2.79 y 2.86 (3H, s, isóm. rot.), 2.90-3.150 (1H, m), 3.20-3.40 (1H, m), 3.79 (3H,

s), 4.80-4.90 (1H, m), 5.00-5.17 (2H, m), 6.75-6.82 (2H, m), 7.07-7.08 (2H, m), 7.27-7.32 (5H, m); ^{13}C RMN (50 MHz, CDCl_3) 32.71, 34.26, 34.66, 55.69, 61.08, 67.93, 68.09, 114.47, 128.07, 128.36, 128.47, 128.94, 129.31, 130.29, 159.00, 176.51; m/z (IQ) 121 (100%), 343 $[(\text{M}+\text{NH}_4)^+]$, 0.4%].

5 BOC-(R)-Leu-OH

Se disolvió (R)-Leu-OH (1 g, 7.63 mmol) en dioxano- H_2O (2:1) (30 ml) se añadió una disolución de NaOH 1N (7.03 ml) y a 0°C se añadió Boc_2O (1.83 g, 8.39 mmol). Después de 24 h a temperatura ambiente se añadió más Boc_2O (0.90 g, 4.19 mmol). Después de 36 horas, se eliminó el disolvente hasta la mitad de su volumen y se enfrió la mezcla de reacción a 0°C se cubrió con AcOEt (30 ml). Seguidamente, se llevó hasta pH 2-3 con disolución de KHSO_4 1M. A continuación, se hicieron extracciones de la fase acuosa con AcOEt (3 x 30 ml) y lavados de la fase orgánica con disolución saturada de NaCl (2 x 10 ml). Se secó la fase orgánica sobre Na_2SO_4 , se filtró y se eliminó el disolvente obteniéndose Boc-(R)-Leu-OH como un aceite (1.79 g, 98%). $[\alpha]_D^{+25}$ (c 1, EtOH); IR (CHCl_3) 3500-3200, 3250-3050, 3000-2800, 2700-2400, 1760, 1720, 1660, 1520, 1400, 1370, 1250, 11670, 1120, 1050, 1030 cm^{-1} ; ^1H RMN (200 MHz, CDCl_3) 1.78 (6H, d, J= 6), 1.46 (9H, s), 1.60-1.90 (3 H, m), 4.82-4.88 (1H, m); ^{13}C RMN (50 MHz, CDCl_3) 22.23, 23.32, 25.22, 28.75, 41.99, 52.46, 80.43, 156.00, 177.64; m/z 57 $[(\text{C}_4\text{H}_9)^+]$, 100%, 130 $[(\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_2\text{N})^+]$, 58%, 186 $[(\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{O}_2\text{N})^+]$, 14.5%, 231.8 $[(\text{M}+\text{H})-2^+]$, 0.6%].

20 BOC-(R)-N(Me)-Leu-OH

Se disolvió Boc-(R)-Leu-OH (1.50 g, 6.49 mmol) en THF (40 ml) y con una fuerte agitación se añadió en pequeñas porciones KOH en polvo (3.49 g, 64.90 mmol) e hidrogenosulfato de tetrabutilamonio (0.15 g, 10% en peso). Seguidamente, se inició una fuerte agitación y se añadió gota a gota Me_2SO_4 (3.68 ml, 39.58 mmol) durante 15 min. Después de 5 horas, se enfrió la mezcla de reacción a 0°C y se añadió H_2O (40 ml). Después de 16 h, se añadió Et_2O (90 ml) a la mezcla de reacción. A continuación, se separó la fase acuosa de la etérea y se hicieron lavados de la fase etérea con disolución saturada de NaHCO_3 (3 x 20 ml). Las fases acuosas se llevaron a pH 3.0-3.5 con disolución de KHSO_4 1N. Seguidamente, se hicieron extracciones de la fase acuosa con AcOEt (3 x 50 ml). Se secaron las fases orgánicas sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se eliminó el disolvente obteniéndose BOC-(R)-N(Me)-Leu-OH como un aceite que cristaliza rápidamente (1.48 g, 93%) Pf $59-61^\circ\text{C}$ (lit.²⁴: Pf $60.5-61.5^\circ\text{C}$); $[\alpha]_D^{+22}$ (c 0.5, EtOH) (lit.²⁴: $[\alpha]_D^{+30.7}$ (c 0.5, EtOH)); IR (film) 3400-3000, 3000-2860, 1740, 1700, 1650, 1450, 1400, 1370, 1320, 1250, 1150 cm^{-1} ; ^1H RMN (200 MHz, CDCl_3) 0.92-0.97 (6H, m), 1.46 (9H, s), 1.50-1.80 (3H, m), 2.79 y 2.81 (3H, s, isóm. rot.), 4.58-4.68 (1H, m); ^{13}C RMN (50 MHz, CDCl_3) 21.11, 21.25, 23.24, 24.64, 24.95, 28.33, 30.55, 37.30, 37.79, 56.05, 56.99, 80.36, 80.63, 159.00, 178.00, 178.20; m/z (IE) 57 $[(\text{C}_4\text{H}_9)^+]$, 100%, 144 $[(\text{C}_7\text{H}_{14}\text{O}_2\text{N})^+]$, 96.4%, 200 $[(\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{O}_2\text{N})^+]$, 12%, 245 $[(\text{M})^+]$, 0.2%].

Boc-D-allo-Ile-OH

Se disolvió H-D-allo-Ile-OH (10 g, 76.3 mmol) en una mezcla de dioxano/ agua (2:1) (300 ml) y a 0°C se añadió disolución 1N de NaOH (76.3 ml) y Boc_2O (18.32 g, 83.93 mmol). Después de 20 h se añadió más Boc_2O (3.33 g, 15.26 mmol) y tras 36 h se eliminó el disolvente hasta la mitad del volumen. Seguidamente, se diluyó la mezcla de reacción con AcOEt (40 ml) se enfrió a 0°C y se acidificó hasta pH 3-4 el crudo de reacción con disolución 1M KHSO_4 . Seguidamente, se hicieron extracciones de la fase acuosa con AcOEt (3 x 50 ml) y se hicieron lavados de la fase orgánica con solución saturada de NaCl (2 x 20 ml). Finalmente, se secó la fase orgánica sobre Na_2SO_4 , se filtró y se eliminó el disolvente, se obtuvo un aceite que cristalizaba en la nevera y que corresponde a a Boc-D -allo-Ile-OH (17.62 g, 100%). Pf $66-68^\circ\text{C}$; $[\alpha]_D^{+15.66}$ (c 1.11, CHCl_3); IR (film) 3500, 3000-2840, 1720, 1710, 1650, 1520, 1500, 1450, 1400, 1370, 1250, 1160, 1080, 1040, 1020, 1000, 940, 900 cm^{-1} ; ^1H RMN (200 MHz, CDCl_3) 0.88-0.99 (6H, m), 1.15-1.60 (2H, m), 1.45 (9H, s), 1.90-2.04 (1H, m), 4.34-4.46 (1H, M), 5.00 (1H, d, J=9), 9.00-9.20 (1H, sa); m/z (IQ) 232.2 $[(\text{M}+\text{H})^+]$, 22%, 249.2 $[(\text{M}+\text{NH}_4)^+]$, 100%; (encontrado: C, 57.6; H, 9.1; N, 6.0. $\text{C}_{11}\text{H}_{21}\text{NO}_4$ requiere C, 57.1; H, 9.1; N, 6.0%).

(4R,5S)-4-(tert-butoxicarbonilamino)-5-metil-3-oxoheptanoato de metilo

Se disolvió CDI seco (5.52 g, 34.6 mmol) en THF anhidro (5 ml) bajo atmósfera de argón, se enfrió a 0°C y se le añadió Boc-D-allo-Ile-OH (4.01 g, 17.3 mmol), previamente secada, disuelta en THF anhidro (5x10 ml). Se dejó que el sistema llegara a temperatura ambiente. A las 4h de reacción se enfrió a -78°C y se añadió vía cánula de litio de acetato de metilo a -78°C (preparación del enolato de litio de acetato de metilo: se añadió AcOMe lentamente durante 1 h 10 min a LDA a -78°C bajo atmósfera de argón: formación de LDA: BuLi 1.6M en hexano (37.8 ml, 60.55 mmol) se añadió con cuidado a una solución de $i\text{Pr}_2\text{NH}$ (10.3 ml, 72.66 mmol) en THF anhidro (12 ml) a -78°C y bajo atmósfera de

argón, antes de añadir el AcOMe se retiró el balón del baño a -78°C durante unos 20 segundos. La temperatura del sistema se dejó aumentar hasta -10°C durante 2 h 15 min. y seguidamente la reacción se paró añadiendo una solución de hidrócloruro amónico sat (100 ml). Se hicieron extracciones con CH_2Cl_2 (4x50 ml) y después de sucesivos lavados con 5% HCl, 5% NaHCO_3 y NaCl aq saturado, se secó con MgSO_4 y se eliminó el disolvente. Se obtuvo un crudo (4.4 g) que se purificó por cromatografía sobre sílica (AcOEt-hexano, 2:8) aislando el producto puro (3.32 g, 67%) como un sólido, p.f. $41-43^{\circ}\text{C}$; Rf 0.24 (AcOEt: Hexano, 1:4); IR (film, CHCl_3) (max 3480-3200, 3040-2840, 1760, 1730, 1710, 1540-1490, 1470, 1440, 1395, 1370, 1325, 1280-1230, 1170, 790 cm^{-1}); ^1H -RMN (200 MHz, CDCl_3) δ 0.79 (3H, d, $J=7.7\text{Hz}$, Me-C₅), 0.97 (3H, t, $J=9\text{Hz}$, Me-C₆), 1.21-1.5 (2H, m, C₆H₂), 1.45 (9H, s, tBuO), 1.85-2.85 (1H, m, C₅H), 3.57 (2H, s, C₂H₂), 3.75 (3H, s, OMe), 4.48 (1H, dd, $J=8.8\text{Hz}$, $J=3.6\text{Hz}$, C₄H), 5.80 (1H, d, $J=8.8\text{Hz}$, NH); ^{13}C -RMN (50 MHz, CDCl_3) δ 11.86 (CH₃, Me-C₆), 13.87 (CH₃, Me-C₅), 26.79 (CH₂, C₆), 28.27 (3CH₃, tBu), 35.98 (CH, C₅), 46.59 (CH₂, C₂), 52.44 (CH₃, OMe), 62.61 (CH, C₄), 80 (C, tBu), 155.9 (CO, Boc), 167.5 (CO), 202.4 (CO, cetona); m/z 288 [(M+H)⁺, 24%], 305 [(M+NH₄)⁺, 100%]; encontrado N, 4.78; C, 58.4; H, 9.31; C₁₄H₂₅NO₅ requiere N, 4.85; C, 58.53; H, 8.77.

Boc-Ist-OMe

El éster metílico de (4R, 5S)-4-(tert -butiloxycarbonilamino)-5-metil-3-oxoheptanoat (1.79 g, 6.24 mmol) se disolvió en MeOH (30 ml), se enfrió a 0°C y se le añadió KBH_4 (1 g, 18.72 mmol). Manteniendo la temperatura a 0°C , después de 13 min se paró la reacción añadiendo 10% HCl gota a gota hasta pH=6. Se hicieron extracciones con Et₂O (3x50 ml), la fase orgánica se lavó con 10% NaHCO_3 y NaCl aq saturado, se secó con MgSO_4 y se eliminó el disolvente. Se obtuvo un aceite (1.71 g, 95%). Rf 0.4 (AcOEt: Hexano, 4:6); $[\alpha]_D -3.4^{\circ}$ (c 1.4, CH_2Cl_2); IR (film, CH_2Cl_2) (max 3600-3300, 2967-2878, 1698, 1518, 1439, 1393, 1368, 1252, 1173, 1074, 989, 887, 777 cm^{-1}); ^1H -RMN (200 MHz, CDCl_3) δ 0.86 (3H, d, $J=5\text{Hz}$, Me-C₅), 0.92 (3H, t, $J=7.5\text{Hz}$, Me-C₆), 1.09-1.45 (2H, m, C₆H₂), 1.44 (9H, s, tBuO), 1.83-2.0 (1H, m, C₅H), 2.41 (2H, m, C₂H₂), 2.79 (1H, sa, OH), 3.59-3.73 (1H, m, C₃H), 3.72 (3H, s, Ome), 3.84-3.98 (1H, m, C₄H), 4.45 (1H, d, $J=10\text{Hz}$, NH); ^{13}C -RMN (50 MHz, CDCl_3) δ 12.09 (CH₃, Me-C₆), 13.46 (CH₃, Me-C₅), 27.45 (CH₂, C₆), 28.70 (3CH₃, tBuO), 34.29 (CH, C₅), 39.34 (CH₂, C₂), 52.15 (CH₃, OMe), 57.34 (CH, C₄), 69.40 (CH, C₃), 79.73 (C, tBuO), 156.63 (CO, Boc), 174.06 (CO); m/z (IQ) 307 [(M+H)⁺, 28%], 290 [(M+H)⁺, 100%]; encontrado C, 58.1; H, 9.3; N, 4.8.

Boc-Ist-OH

Boc-Ist-OMe (0.5 g, 1.73 mmol) se disolvió en dioxano (4 ml), se le añadió 1M NaOH (4 ml). Se dejó a temperatura ambiente durante 50 min. Después, se añadió 1M HCl hasta pH=7 y seguidamente se eliminó el dioxano. Se acidificó con 1M HCl hasta pH=4, se hicieron extracciones del ácido con AcOEt (5x20 ml), se secó con MgSO_4 y se eliminó el disolvente. Se obtuvo Boc-Ist-OH (442 mg, 93%) en forma de aceite, Rf 0.25 (AcOEt: Hexano, 6: 4); $[\alpha]_D -5.2^{\circ}$ (c 2.6, CHCl_3) (lit.²², -8.7° , c 2.4, CHCl_3); IR (film, CH_2Cl_2) (max 3600-3200, 300-2850, 1710, 1690, 1525 (ancho), 1460, 1400, 1370, 1260, 1170, 1080, 900 cm^{-1}); ^1H -RMN (200 MHz, CDCl_3) δ 0.85 (3H, d, $J=5\text{Hz}$, Me-C₅), 0.90 (3H, t, $J=7.3\text{Hz}$, Me-C₆), 1.15-2.00 (1H, m, C₆H₂), 1.44 (9H, s, isómeros rotacionales, tBuO), 1.8-2.00 (1H, m, C₅H), 2.4-2.75 (2H, m, C₂H), 3.5-3.72 (1H, m, C₃H), 3.88-4.05 (1H, m, C₄H), 4.57 (1H, d, $J=9\text{Hz}$, isómero rotacional, NH), 5.93 (1H, d, $J=9\text{Hz}$, isómero rotacional, NH); ^{13}C -RMN (50 MHz, CDCl_3) δ 11.36 (CH₃, Me-C₆), 12.90 (CH₃, Me-C₅), 26.72 (CH₂, C₆H₂), 27.93 (3CH₃, tBuO), 33.54 (CH, C₅H), 38.35 (CH₂, C₂H₂), 56.46 (CH, C₄H), 68.73 (CH, C₃H), 78.1 (C, tBuO), 155.6 (CO, Boc), 173.35 (CO, COOH); m/z (IQ) 293 [(M+NH₄)⁺, 100%], 276 [(M+H)⁺, 95%]; encontrado C, 55.7; H, 9.4; N, 4.8; C₁₃H₂₅NO₄ requiere C, 56.7; H, 9.1; N, 5.1.

Boc-Ist(OTBDMS)-OH

a) Boc-Ist-OH

(646.5 mg, 2.35 mmol), TBDMS-Cl (1.77 g, 11.75 mmol) e imidazole (2.56 g, 37.6 mmol) se mezclaron con DMF anhidro (0.7 ml), se dejó a temperatura ambiente y con fuerte agitación magnética. A las 18 h de reacción se eliminó la DMF a presión reducida, se añadió AcOEt (30 ml) y se lavó sucesivamente con 10% KHSO_4 y H_2O , se secó con MgSO_4 y se eliminó el disolvente. Se obtuvo un aceite (1.29 g) correspondiendo al producto bisililado Boc-Ist(TBDMS)-OTBDMS. Rf 0.65 (AcOEt-hexano, 3:7); ^1H -RMN (200 MHz, CDCl_3) δ 0.05-0.1 (9H, 3s, 3MeSi), 0.28 (3H, MeSi), 0.82 (9H, s, tBuSi), 0.8-0.95 (6H, m, Me-C₅ y Me-C₆), 0.93 (9H, s, tBuSi), 1.20-1.44 (2H, m, C₆H₂), 1.42 (9H, s, tBuO), 1.65-1.8 (1H, m, C₅H), 2.4-2.65 (2H, m, C₂H₂), 3.55-3.7 (1H, m, C₃H), 4.1-4.2 (1H, m, C₄H), 4.42 (1H, d, $J=10\text{Hz}$, NH); m/z (IQ) 504 [(M+H)⁺, 10%], 522 [(M+NH₄)⁺, 2%], 448 [(M-C₄H₉)⁺, 5%], 404 [(M-C₅H₉O₂)⁺, 7%], 389 [(M-C₆H₁₅Si)⁺, 5%].

- b) El producto bisililado Boc-Ist(TBDMS)-OTBDMS (1.29 g) se disolvió en dioxano (25 ml) y se le añadió NaOH 0.5M gota a gota hasta pH=10-12. Después de agitar la mezcla durante 2 min, se añadió HCl 1N hasta pH=7. Se eliminó el dioxano y la solución se acidificó con HCl 0.5N hasta pH=4, se hicieron extracciones del ácido con AcOEt (4x20 ml), se secó con MgSO₄ y se eliminó el disolvente. El crudo (1.150 g) que se obtuvo se purificó por cromatografía sobre sílica gel (AcOEt-hexano, 1.25:8.75) aislando Boc-Ist(TBDMS)-OH (538 mg, 79%), p.f. 40-45°C. Rf 0.35 en forma de cola (AcOEt-hexano y 1 gota AcOH, 2:8) [α]_D +1.8° (c 0.8, CH₂Cl₂) (lit.²²: [α]_D +1.74, c 2.64, CHCl₃); IR (film, CH₂Cl₂) (max 3.400-3220, 3160-3080, 3020-2840, 1770, 1665, 1090, 1410, 1170, 1260, 1180, 1090, 1005, 945, 840, 680 cm⁻¹); ¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃) 0.1 (6H, sa, Me₂Si), 0.82-0.94 (6H, m, Me-C₅ y Me-C₆), 0.89 (9H, s, tBuSi), 1.20-1.31 (2H, m, C₆H₂), 1.47 (9H, s, isómeros rotacionales, tBuO), 1.72-1.86 (1H, m, C₅H), 2.42-2.65 (2H, m, C₂H₂), 3.45-3.65 (1H, m, C₃H), 4.05-4.20 (1H, m, C₄H), 4.69 (1H, d, J=10Hz, isómero rotacional, NH), 6.75 (1H, d, J=10Hz, isómero rotacional, NH); ¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃) d -4.92 (CH₃, Me-Si), -4.40 (CH₃, Me-Si), 11.94 (CH₃, Me-C₆), 12.80 (CH₃, Me-C₅), 17.75 (C, tBuSi), 25.76 (3CH₃, tBuSi), 26.95 (CH₂, C₆), 28.32 (3CH₃, tBuO), 34.18 (CH, C₅), 41.85 (CH₂, C₂), 60.13 (CH, C₄), 70.12 (CH, C₃), 158.25 (CO, Boc), 174.8 (CO, COOH); m/z (IQ) 408 [(M+NH₄)⁺, 4%], 390 [(M+H)⁺, 100%].

TBDMS-(2RS, 4S)-Hip-OBzl

- Caracterización: Rf 0.39 (AcOEt-hexano, 1:9); IR (film, CH₂Cl₂) (max 3090-300, 1959-2859, 1750, 1725, 1499, 1456, 1389, 1319, 1254, 1190, 1072, 1007, 958, 839, 779 cm⁻¹); ¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃) d 0.01 (3H, s, MeSi), 0.04 (3H, s, MeSi), 0.92 (9H, s, tBuSi), 0.82-0.95 (6H, m, 2 Me-C₅), 1.36 (3H, d, J=7.5Hz, Me-C₂), 1.94-1.12 (1H, m, C₅H), 3.94-4.07 (2H, m, C₄H y C₂H), 5.11 (2H, s, CH₂ benc.), 7.35 (5H, sa, aromat.); ¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃) d -5.17 y -4.92 (CH₃, MeSi, 2 diast.), -4.82 y -4.28 (CH₃, MeSi, 2 diast.), 13.68 y 13.71 (CH₃, Me-C₅, 2 diast.), 17.08 y 17.24 (CH₃, Me-C₅, 2 diast.), 18.19 (3 CH₃, tBuSi), 18.86 y 18.98 (CH₃, Me-C₂, 2 diast.), 31.51 y 32.38 (CH, C₅, 2 diast.), 47.16 y 47.41 (CH, C₂, 2 diast.), 66.86 y 67.06 (CH₂, benc. 2 diast.), 82.60 y 83.20 (CH, C₄, 2 diast.), 128.19-128.53 (5CH, m, aromat.), 135.28 (C, aromat.), 170.11 y 170.31 (CO, 2 diast.), 206.89 y 206.37 (CO, cetona, 2 diast.); m/z (FAB) 401 [(M+Na)⁺, 10%], 379.2 [(M+H)⁺, 72%], 321.1 [(M-C₄H₉+H)-2⁺, 100%], 271.1 [(M-C₆H₅CH₂O+H)-2⁺, 93%]; HPLC tr 22.1 min en una columna nucleosil C18 (φ=10 m) (fase reversa) haciendo un gradiente lineal de 10% B hasta 100% B en 20 min, seguido de 10 min de elución isocrática al 100% B, (A: H₂O+0.045% TFA, B: MeCN+0.036% TFA), flujo= 1 ml/min, detección= 220 nm.

Boc-Thr(Bzl)-OSEM

- En un sistema anhidro, con tamiz molecular activo y bajo atmósfera de argón, se introdujo Li₂CO₃ (1.08 g, 14.56 mmol), Boc-Thr(Bzl)-OH (3.07 g, 9.93 mmol) disuelta en DMF (10 ml) y se le adicionó SEM-Cl (2.6 ml, 14.56 mmol) a temperatura ambiente. A las 18 h de reacción se filtró sobre celite, se le añadió H₂O (20 ml) y se eliminó la DMF a presión reducida. Se hicieron extracciones con AcOEt (5x20 ml) y la fase orgánica se lavó con una solución saturada de NaCl y se secó con MgSO₄ y se eliminó el disolvente. Se obtuvo un crudo (3.5 g) que se purificó por cromatografía sobre sílica gel (AcOEt-hexano, 1:9) obteniendo Boc-Thr(Bzl)-OSEM en forma de aceite (2.4 g, 78%) y recuperando Boc-Thr(Bzl)-OH (0.95 g). Rf 0.51 (AcOEt-hexano, 3:7); [α]_D -1.35° (c 0.67, CH₂Cl₂); IR (film, CH₂Cl₂) (max 3500-3275, 2979-2875, 1721, 1501, 1368, 1250, 1167, 1070 cm⁻¹); ¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃) d 0.02 (9H, s, 3 Me-Si), 0.90-0.99 (2H, m, CH₂-Si), 1.31 (3H, d, J=6.3Hz), 1.49 (9H, s, tBu), 3.65-3.72 (2H, m, CH₂-O), 4.12-4.25 (1H, m), C(H), 4.3-4.41 (1H, m), C(H), 4.39-4.63 (2H, m, benc.), 5.28-5.34 (3H, m, O-CH₂-O, NH), 7.29-7.33 (5H, ar.); ¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃) d -1.51 (3 CH₃, Me-Si), 16.23 (CH₃, C₉), 17.89 (CH₂, C-Si), 28.26 (3CH₃, tBu), 58.28 (CH, C₄), 68.04 (CH₂, C-O), 70.86 (CH₂, benc.), 74.56 (CH, C₆), 79.81 (C, tBu), 89.83 (CH₂, O-C-O), 127.15-127.31 (5CH, ar), 137.83 (C, ar), 156.09 (CO, Boc), 170.79 (CO); m/z (IQ) 457 [(M+NH₄)⁺, 100%], 440 [(M+H)⁺, 48%]; HPLC tr 22.3 min en una columna nucleosil C18 (φ=10 m) (fase reversa) haciendo un gradiente lineal de 10% B hasta 100% B en 20 min seguido de 10 min de elución isocrática al 100% B, (A: H₂O+0.045% TFA, B: MeCN+0.036% TFA), flujo= 1 ml/min, detección= 220 nm.

Boc-Thr-OSEM

- Boc-Thr-OSEM (950 mg; 2.16 mmol) disuelto en MeOH (10 ml) se añadió a una suspensión de 10% Pd-C (146 mg) en MeOH (25 ml) bajo atmósfera de N₂. Se cambió la atmósfera de N₂ por H₂ y después se purgó el sistema. Después de 60 min, se filtró sobre celite, se lavó con MeOH y se eliminó el disolvente. Se obtuvo un aceite (730 mg, 97%) correspondiendo a Boc-Thr-OSEM que no se purificó. Rf 0.30 (AcOEt-hexano, 3:7); [α]_D -8.4° (c 1.03, CH₂Cl₂); IR (film, CH₂Cl₂) (max 3550-3350, 2979-2880, 1719, 1508, 1368, 1250, 1165, 1113 cm⁻¹); ¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃) d 0.02 (9H, s, Me₃Si), 0.92-1.01 (2H,

M. CH₂Si), 1.27 (3H, d, J=6.3 Hz, Me-C₆), 1.45 (9H, s, tBu), 3.69-3.77 (2H, m, CH₂-O), 4.22-4.41 (2H, m, C_αH, C_βH), 5.36-5.38 (3H, m, O-CH₂-O, NH); ¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃) δ -1.46 (3 CH₃, MeSi), 17.98 (CH₂, C-Si), 19.94 (CH₃, C₉), 28.27 (3 CH₃, tBu), 58.47 (CH, C₆), 68.13 (CH, C_α), 68.18 (CH₂, C-O), 80.01 (C, tBu), 89.89 (CH₂, O-C-O), 157.06 (CO, Boc), 171.14 (CO); m/z (IQ) 367 [(M+NH₄)⁺, 100%], 350 [(M+H)⁺, 25%]; HPLC tr 19.5 min en una columna nucleosil C18 (φ= 10 m) (fase reversa) haciendo un gradiente lineal de 10% B hasta 100% B en 20 min seguido de 10 min de elución isocrática al 100% B. (A: H₂O+0.045% TFA, B: MeCN+0.036% TFA), flujo= 1 ml/min, detección= 220 nm.

Boc-Thr[Z-N(Me)-O(Me)-Tyr]-OSEM

10 Z-N(Me)-O(Me)-Tyr-OH (191.7 mg, 0.56 mmol), Boc-Thr-OSEM (150 mg, 0.43 mmol) y DMAP (15.3 mg, 0.12 mmol) se disolvió en CH₂Cl₂ (250 ml), se enfrió el sistema a -10°C y se le añadió DCC (120.5 mg, 0.559 mmol) en CH₂Cl₂ (250 ml). Se dejó a temperatura ambiente durante 15 h. A continuación se enfrió el sistema, se le añadió CH₂Cl₂ (5 ml) y se filtró en frío, se lavó con CH₂Cl₂ frío (10 ml) y la
15 fase orgánica se lavó sucesivamente con soluciones de 5% KHSO₄, 5% NaHCO₃ y solución saturada de NaCl. Se secó con MgSO₄ y se eliminó el disolvente y el crudo que se obtuvo (310 mg) se purificó por cromatografía sobre sílica gel (AcOEt-hexano, 1.7:8.3) aislando Boc-Thr[Z-N(Me)-O(Me)-Tyr]-OSEM (186 mg, 65%) en forma de aceite. Rf 0.36 (AcOEt-hexano, 2:8); [α]_D -1.3° (c 1.16, CH₂Cl₂); IR (film, CH₂Cl₂) (max 3450-3050, 2957-2838, 1742, 1705, 1613, 1586, 1514, 1454, 1402, 1308, 1248, 1180, 1142,
20 1109, 1034 cm⁻¹; ¹H-RMN-(200 MHz, CDCl₃) δ 0.03 (9H, s, Me₃Si), 0.91-1.00 (2H, m, CH₂-Si), 1.31 (3H, d, J=6.3 Hz, Me-C₆ Thr), 1.46 (9H, s, tBu), 2.73 y 2.81 (3H, NMe, isómeros rotacionales), 2.85-3.04 (1H, m, C_β Tyr), 3.10-3.30 (1H, m, C_β Tyr), 3.65-3.79 (2H, m, CH₂O), 3.78 (3H, s, MeO), 4.43-4.51 (1H, m, C_αH Thr), 4.69-4.88 (1H, m, C_αH Tyr), 5.06-5.40 (5H, m, 2H benc., O-CH₂-O, NH), 5.40-5.52 (1H, m, C_βH Tyr), 6.75-6.81 (2H, m, ar. Tyr), 6.99-7.71 (2H, m, ar. Tyr), 7.31-7.32 (5H, ar.); ¹³C-RMN
25 (50 MHz, CDCl₃) δ -1.46 (3 CH₃, Me-Si), 16.74 y 17.01 (CH₃, Me Thr, isómeros rot.), 17.95 (CH₂, C-Si), 28.24 (3 CH₃, tBu), 31.64 y 32.19 (CH₃, NMe, isómeros rot.), 33.86 y 34.17 (CH₂, C (Tyr, isómeros rot.), 55.14 (CH₃, OMe), 56.88 y 57.05 (CH, C₉ Thr, isómeros rot.), 67.28 y 68.24 (2 CH₂, benc., C-O), 71.52 y 71.74 (CH, C_α Thr, isómeros rot.), 80.21 (C, tBu), 90.40 (CH₂, O-C-O), 113.88 (2 CH, C_{Ar}H Tyr orto al OMe), 127.62-128.79 (5CH, C_{Ar}H Bzl), 129.40-129.80 (2 CH, C_{Ar}H Tyr meta al
30 OMe), 138.67 (C, C_{Ar} Bzl), 137.84 (C, C_{Ar} Tyr), 138.53 (CO, Boc), 158.31 (CO, Z), 169.59 y 169.72 (2 CO); m/z (FAB) 697 [(M+Na)⁺, 17%], 675 [(M+H)⁺, 5%], 561 [(M-C₆H₅CH₂+Na)²⁺, 22%], 545 [(M-Me₃SiCH₂CH₂OCH₂+H)⁺, 13%], 517 [(M-C₆H₅CH₂OCO+Na)⁺, 65%]; HPLC tr 21.4 min en una columna nucleosil C18 (φ= 10 m) (fase reversa) haciendo un gradiente lineal de 10% B hasta 100% B en 20 min seguido de 10 min de elución isocrática al 100% B. (A: H₂O+0.045% TFA, B: MeCN+0.036%
35 TFA), flujo= 1 ml/min, detección= 220 nm.

Boc-Thr[Z-N(Me)-O(Me)-Tyr]-OH

40 Boc-Thr[Z-N(Me)-O(Me)-Tyr]-OSEM (358 mg, 0.519 mmol) se disolvió en MeCN (2.767 ml) y se enfrió a -25°C. Se le añadió gota a gota una solución de 15% H₂Faq en MeCN (1.383 ml) previamente enfriada a -25°C y la temperatura del sistema se mantuvo a -15°C durante 7 h. Después se le añadió una solución previamente enfriada de 10% KHSO₄ (18 ml) y AcOEt (15 ml), y antes de extraer con más AcOEt se neutralizó la fase acuosa con una solución saturada de NaHCO₃ hasta pH 4. Se hicieron extracciones con AcOEt (4x20 ml), se secó con MgSO₄ y se eliminó el disolvente, obteniendo un crudo
45 (313 mg) que se purificó por cromatografía sobre sílica (MeOH-CH₂Cl₂, 0.3:9.7) obteniendo Boc-Thr[Z-N(Me)-O(Me)-Tyr]-OH (203.6 mg, 72%) en forma de un sólido blanco. Rf 0.21 (AcOEt-hexano, 6:4); [α]_D -20.5° (c 2, CH₂Cl₂); IR (film, CH₂Cl₂) (max 3450-3350, 3075-3020, 2979-2825, 1715, 1613, 1514, 1456, 1402, 1368, 1248, 1165, 1061, 1036 cm⁻¹; ¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃) δ 1.29 (3H, d, J=6.5 Hz, Me Thr), 1.45 (9H, s, tBu), 2.74 y 2.75 (3H, s, NMe, isómeros rot.), 2.76-3.31 (2H, m, C_βH₂ Tyr), 3.77 (3H, s, OMe), 4.42-4.52 (1H, m, C_αH Thr), 4.66-4.83 (1H, m, C_αH Tyr), 5.01-5.16 (2H, m, benc.), 5.30-5.53 (2H, m, NH Boc, C_βH Thr) 6.72-6.81 (2H, m, C_{Ar}H Tyr), 6.95-7.09 (2H, m, C_{Ar}H Tyr), 7.35 (5H, C_{Ar}H);
50 ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 16.44 y 16.82 (CH₃, Me Thr), 28.23 (CH₃, tBu), 31.71 y 31.97 (CH₃, NMe), 33.82 y 33.68 (CH₂, C_βH₂ Tyr), 55.14 (CH₃, OMe), 56.87 y 56.75 (CH, C₉ Tyr), 60.58 y 60.39 (CH, C_αH Tyr), 67.51 y 67.76 (CH₂, benc.), 71.83 y 72.47 (CH, C_α Thr), 80.40 (C, Boc), 113.91 (2 CH, C_{Ar}H Tyr orto al OMe), 127.59-128.69 (5 CH, C_{Ar}H Bzl), 129.77 (2 CH, C_{Ar}H Tyr meta al OMe), 236.42 (C, C_{Ar} Bzl), 156.00 y 156.19 (2 C, C_{Ar} Tyr), 156.71 (CO, Boc), 158.31 (CO, Z), 159.47 (CO), 169.78 (CO); m/z (FAB) 567.1 [(M+Na)⁺, 46%], 545.1 [(M+H)⁺, 7%], 445.1 [(M-C₆H₅O₂+H)⁺, 100%]. HPLC tr
55 FALTA, min en una columna nucleosil C18 (φ= 10 m) (fase reversa) haciendo un gradiente lineal de 10% B hasta 100% B en 20 min seguido de 10 min de elución isocrática al 100% B. (A: H₂O+0.045% TFA, B: MeCN+0.036% TFA), flujo= 1 ml/min, detección= 220 nm.
60

Boc-Leu-Pro-OBzl

Pro-OBzl.HCl (7.3 g, 0.030 mol) se disolvió en CH₂Cl₂ (25 ml) y se le añadió NMM (4.63 ml, 0.0620 mol) a 0°C. Después de 10 minutos y con fuerte agitación magnética se añadió Boc-Leu-OH (3 g, 0.012 mol), DCC (3.22 g, 0.0156 mol) y HOBt (1.82 g, 0.0132 mol). Se dejó que la temperatura del sistema subiera de 0°C a temperatura ambiente y a las 18 h de reacción se enfrió el crudo a -10°C, se filtró, se eliminó el CH₂Cl₂ y se redisolvió en AcOEt (80 ml). Después de sucesivos lavados con soluciones de 10% KHSO₄, 10% NaHCO₃ y NaCl saturado, la fase orgánica se secó con MgSO₄ y se eliminó el disolvente. Se obtuvo un crudo (9.65 g) que se purificó por cromatografía sobre sílica (AcOEt-hexano, 1:5:8.5), aislandose Boc-Leu-Pro-OBzl (3.64 g, 72%) en forma de aceite. Rf 0.41 (AcOEt-hexano, 3:7) [α]_D -64.7° (c 2, CH₂Cl₂); IR (film, CH₂Cl₂) (max 3450-3305, 2957, 2871, 1746, 1709, 1651, 1501, 1429, 1391, 1366, 1250, 1169, 1045, 1022 cm⁻¹); ¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃) δ 0.90 (3H, d, J=6.6 Hz, Me Leu), 0.96 (3H, d, J=6.5 Hz, Me Leu), 1.42 (9H, s, tBu), 1.65-1.92 (3H, m, C_βH Leu, C_βH₂ Leu), 1.92-2.28 (4H, m, C_βH₂ Pro, C_γH₂ Pro), 3.50-3.80 (2H, m, C_αH₂ Pro), 4.32-4.54 (1H, m, C_αH Leu), 4.54-4.75 (1H, m, C_αH Pro), 5.05-5.23 (3H, CH₂ benc., NH Boc), 7.34 (5H, Ar); ¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃) δ 22.19 (CH₃, Cd Leu), 23.89 (CH₃, Cd Leu), 24.99 (CH, C_γ Leu), 25.38 (CH₂, C_γ Pro), 28.83 (3 CH₃, tBu), 29.45 (CH₂, C_β Pro), 42.46 (CH₂, C_β Leu), 47.18 (CH₂, C_α Pro), 50.72 (CH, C_α Leu), 59.31 (CH, C_α Pro), 67.39 (CH₂, benc.), 79.99 (C, tBu), 128.66-129.04 (5 CH, 3 s, 2 CArH orto, 2 CArH meta, CArH para), 136.1 (C, CAr), 156.2 (CO, BOC), 172.32 (2 CO); m/z (FAB) 453.3 [(M+Cl)⁻, 3%], 419.3 [(M+H)⁺, 39%], 363.3 [(M-C₄H₉+H)⁺, 45%], 319.1 [(M-C₅H₉O₂)⁺, 72%].

H-Leu-Pro-OBzl, CF₃OOH

Boc-Leu-Pro-OBzl (2.253 g, 5.39 mmol) se trató con 60% TFA en CH₂Cl₂ durante 2 h 15 min a temperatura ambiente. Se evaporó a sequedad y se hicieron coevaporaciones con éter anhidro. Se obtuvo H-Leu-Pro-OBzl, CF₃OOH (2.265 g, 99%) en forma de aceite. m/z 319 (M⁺, 100%)

TBDMS-Hip-Leu-Pro-OBzl

TBDMS-Hip-OBzl (1.399 g, 3.696 mmol) se disolvió en THF (9 ml) y se añadió a una suspensión de 10% Pd-C (235 mg) en THF (5 ml) bajo N₂. Se cambió la atmósfera inerte por H₂ y se purgó el sistema. Después de 2 horas a temperatura ambiente, el sistema se enfrió a -20°C y el crudo de hidrogenolisis se filtró a través de celite, y se lavó con THF (20 ml). Las aguas de filtración se recogieron directamente sobre HBTU (1.467 g, 3.881 mmol) y HOBt (0.509 g, 3.696 mmol) a -10°C, y a continuación se le añadió DIEA (628 ml, 3.696 mmol). Después de 3 minutos se le añadió H-Leu-Pro-OBzl.CF₃COOH (2.15 g, 4.989 mmol) disuelto en THF (6.5 ml) y DIEA (1.487 ml, 8.685 mmol). El sistema se mantuvo a -5°C durante 3h. Después se dejó a temperatura ambiente 16 h. Se eliminó el THF y el residuo se disolvió en AcOEt (50 ml), se lavó con soluciones de 5% KHSO₄, 5% NaHCO₃ y NaCl saturado, se secó con MgSO₄ y se evaporó a sequedad. El crudo que se obtuvo (2.52 g) se purificó por cromatografía sobre sílica (AcOEt-hexano, 3:7) aislando TBDMS-Hip-Leu-Pro-OBzl como mezcla diastereoisomérica (diast. A: diast. B, 1:1) (1.793 g, 83%) en forma de aceite que posteriormente solidificó. Rf 0.35 y 0.29 (AcOEt-hexano, 4:6); IR (film, CH₂Cl₂) (max 3295 (ancho), 3060 y 3040 (débiles), 2957, 2934, 2880, 2858, 1736, 1634, 1528, 1454, 1387, 1252, 1171, 1070 cm⁻¹); ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 0.01-0.03 (6H, 2 sa, 2 Me-Si), 0.85-0.97 (12H, m, 2 Me Leu, 2 Me Me-C₅ Hip), 0.92 y 0.93 (9H, s, tBu), 1.33 (3H, J=7Hz, Me-C₂ Hip, diast. A), 1.37 (3H, J=7Hz, Me-C₂ Hip, diast. B), 2.40-2.65 (3H, m, C_βH₂ Leu, C_γH Leu), 1.92-2.28 (4H, C_βH₂ Pro, C_γH₂ Pro), 3.64-3.76 (1H, m, C_αH Pro), 4.69-4.82 (1H, m, C_αH Leu), 5.05-5.24 (2H, sist. AB, benc.), 6.73 (1H, d, J=9 Hz, NH Leu, diast A), 6.98 (1H, d, J=9 Hz, NH Leu, diast B), 7.34 (5H, sa, Ar); ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ -5.24 (CH₃, MeSi), -4.81 (CH₃, MeSi), 15.70 (CH₃, Me-C₅ Hip), 17.43 y 17.57 (CH₃, Me-C₅ Hip), 18.84 (CH₃, Me-C₂ Hip), 21.48 y 21.61 (CH₃, Me Leu), 18.053 (C, tBu-Si), 23.28 (CH₃, Me Leu), 24.43 y 24.55 (CH, C_γ Leu), 24.76 (CH₂, C_γ Pro), 25.68 (3 CH₃, tBu), 28.87 (CH₂, C_β Pro), 31.36 y 31.77 (CH, C₅ Hip), 41.27 y 41.67 (CH₂, C_α Pro), 48.68 y 48.55 (CH, C₂ Hip), 48.89 (CH, C_α Leu), 58.71 (CH, C_α Pro), 66.84 (CH₂, benc.), 83.84 y 83.29 (CH, C₄ Hip), 128.09-128.47 (5 CH CAr), 135.40 (C, CAr), 169.24 (CO), 170.67 y 170.89 (CO), 171.16 y 171.20 (CO), 209.11 y 211.62 (CO, cetona); m/z (IQ) 589 [(M+H)⁺, 100%]; HPLC tr 22.7 min en una columna nucleosil C18 (φ=10 m) (fase reversa) haciendo un gradiente lineal de 10% B hasta 100% B en 20 min seguido de 10 min de elución isocrática al 100% B, (A: H₂O+0.045% TFA, B: MeCN+0.036% TFA), flujo= 1 ml/min, detección= 220 nm.

H-Hip-Leu-Pro-OBzl

TBDMS-Hip-Leu-Pro-OBzl (0.908 g, 1.544 mmol) y TBAF (1.027 g, 3.242 mmol) previamente secados, se disolvieron en THF anhidro (17 ml) a temperatura ambiente. Después de 30 minutos se paró la

reacción añadiendo H₂O (30 ml). Se hicieron extracciones con AcOEt (4x40 ml) y se lavó la fase orgánica con una solución saturada de NaCl, se secó y se eliminó el disolvente. El crudo que se obtuvo se purificó por cromatografía sobre sílica (AcOEt-hexano, 4:6) aislando la mezcla diastereoisomérica (A:B, 1:1) de H-Hip-Leu-Pro-OBzl (708.4 mg, 97%) en forma de un sólido blanco. Rf 0.37 y 0.20 (AcOEt-hexano, 1:1); IR (film, CH₂Cl₂) (max 3450-3293, 3060 y 3040 (débiles), 2961, 2946, 2883, 2852, 1746, 1632, 1533, 1454, 1357, 1387, 1265, 1173, 1095, 1045, 1018 cm⁻¹); ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 0.71 (3H, d, J=7 Hz, Me-C₅ Hip, diast. B), 0.81 (3H, d, J=6.5 Hz, Me-C₅ Hip, diast. A), 0.88 (3H, d, J=6.5 Hz, Me Leu, diast. A), 0.91 (3H, d, J=6.5 Hz, Me Leu, diast. A), 0.94 (3H, d, J=6.5 Hz, Me Leu, diast. B), 0.99 (3H, d, J=7 Hz, Me-C₅ Hip, diast. A), 1.07 (3H, d, J=6.5 Hz, Me-C₅ Hip, diast. B), 1.43-1.52 (2H, m, C₆H₂ Leu), 1.60-1.66 (1H, m, C₉H Leu), 1.93-1.20 (3H, m, C₉H₂ Pro, 1H de C₆H₂ Pro), 2.12-2.23 (2H, m, 1H de C₆H₂ Pro, C₅H Hip), 3.53-3.58 (1H, m, 1H de C₄H₂ Pro), 3.65 (1H, q, J=7 Hz, C₂H Hip, diast. B), 3.67-3.73 (1H, m, 1H C₄H₂ Pro), 3.89 (1H, q, J=7 Hz, C₂H Hip, diast. A), 3.96 (1H, d, J=4 Hz, C₄H Hip, diast. A), 4.22 (1H, d, J=4 Hz, C₄H Hip, diast. B), 4.54-4.56 (1H, m, C₆H Pro), 4.58-4.62 (1H, m, C₆H Leu, diast. A), 4.69-4.73 (1H, m, C₆H Leu, diast. B), 5.05-5.18 (2H, 4sa, sist. AB, benc.), 6.57 (1H, d, J=8.5 Hz, NH Leu, diast. A), 6.63 (1H, d, J=8.5 Hz, NH Leu, diast. B) ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 14.06 y 14.26 (CH₃, Me-C₅ Hip), 15.85 y 16.48 (CH₃, Me-C₅ Hip), 20.07 y 20.53 (CH₃ Me Leu), 22.02 y 22.25 (CH₃ Me Leu), 25.37 (CH, C₉ Leu), 25.46 (CH₂ C₉ Pro), 29.45 y 29.53 (CH₂ C₆ Pro), 31.59 y 32.09 (CH, C₅ Hip), 41.13 y 42.29 (CH₂ C₄ Pro), 49.93 (CH, C₆ Pro), 50.91 y 51.02 (CH, C₂ Hip), 59.52 (CH, C₆ Leu), 67.60 (CH₂, benc.), 81.02 (CH, C₄ Hip), 128.78-1.29.2 (5 CH, CAr), 169.48 (CO), 171.58 (CO), 172.17 (CO), 209.76 (CO, cetona); m/z (IQ) 492 [(M+NH₄)⁺, 100%], 475 [(M+H)⁺, 61%]; HPLC tr 17.5 y 16.5 min en una columna nucleosil C18 (φ= 10 m) (fase reversa) haciendo un gradiente lineal de 10% B hasta 100% B en 20 min seguido de 10 min de elución isocrática al 100% B, (A: H₂O+0.045% TFA, B: MeCN+0.036% TFA), flujo= 1 ml/min, detección= 220 nm.

25 Boc-Ist(TBDMS)-Hip-Leu-Pro-OBzl

Método I

En un micro reactor se disolvió Boc-Ist(TBDMS)-Hip-Leu-OH (10 mg, 15.69 mmol) en DMF anhidro (20 ml), se enfrió a -20°C y bajo atmósfera de argón se le añadió HOBt (2 mg, 15.69 mmol), HBTU (6 mg, 15.69 mmol) en DMF (40 ml) y DIEA (2.7 ml, 15.69 mmol) en DMF (12 ml) Después de 3 minutos a -15°C se añadió ProOBzl.HCl (8 mg, 29.81 mmol) en DMF (18 ml) y DIEA (6.7 ml, 47.07 mmol) en DMF (36 ml). La temperatura del sistema se dejó subir hasta temperatura ambiente y a las 4 horas se paró la reacción. Se añadió AcOEt (10 ml) y se hicieron sucesivos lavados con 5% KHSO₄, 5% NaHCO₃ y solución saturada de NaCl, la fase orgánica se secó y se eliminó el disolvente. Se obtuvo un crudo (15 mg) que se purificó por cromatografía sobre sílica (MeOH-CH₂Cl₂, 0.5:9.5) aislando la mezcla diastereoisomérica de BOC-Ist(TBDMS)-Hip-Leu-Pro-OBzl (11 mg, 84%).

Método II

H-Hip-Leu-Pro-OBzl (194.6 mg, 0.410 mmol), Boc-Ist(TBDMS)-OH (149 mg, 0.384 mmol) y DMAP (16 mg, 0.134 mmol) se disolvió en CH₂Cl₂ anhidro (746 ml) bajo atmósfera inerte. Se enfrió entre -5°C y -10°C y se le adicionó gota a gota DCC (95 mg, 0.461 mmol) en CH₂Cl₂ (154 ml) durante 15 minutos. La temperatura del sistema se mantuvo entre -10°C y -5°C durante 5 horas y a 2°C durante 12 horas. El crudo se enfrió y se filtró, se lavó con disolución saturada de NaCl y se eliminó el disolvente; el residuo obtenido se volvió a disolver en AcOEt (40 ml) y se hicieron sucesivos lavados con soluciones de 5% KHSO₄, 5% NaHCO₃ y NaCl saturado. Se secó la fase orgánica y se eliminó el disolvente obteniéndose un crudo (412 mg) que se purificó por cromatografía sobre sílica (AcOEt-hexano, 3:7) aislandose la mezcla diastereoisomérica de Boc-Ist(TBDMS)-Hip-Leu-Pro-OBzl (220 mg, 78%). Rf 0.44 y 0.14 (AcOEt-hexano, 3.5:6.5); IR (film, CH₂Cl₂) (max 3365-3200, 3069 y 3038 (débiles), 2959, 2930, 2882, 2857, 1746, 1688, 1640, 1533, 1456, 1389, 1258, 1171, 1086, 995 cm⁻¹); ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 0.01 y 0.03 (3H, s, Me-Si, diast. A y B), 0.05 y 0.07 (3H, s, Me-Si, diast. A y B), 0.77-1.03 (18H, m, 2 Me-C₅ Hip, Me-C₆ Ist, Me-C₅ Ist, 2 Me Leu), 0.84 y 0.85 (9H, s, tBu, diast. A y B), 1.32-1.36 (2H, m, C₆H₂ Ist), 1.49 (3H, d, J=7.5 Hz, Me-C₂ Hip, diast. A), 1.33 (3H, d, J=7 Hz, Me-C₂ Hip, diast. B), 1.38-1.62 (3H, m, C₆H₂ Leu, C₉H Leu), 1.42 y 1.44 (9H, s, tBu, diast. A y B), 1.51-1.77 (1H, m, C₅H Ist), 1.88-2.37 (m, 3H, C₉H₂ Pro, 1H de C₆H₂ Pro), 2.17-2.33 (2H, m, C₅H Hip, 1H de C₆H₂ Pro), 2.47-2.74 (2H, m, C₂H₂ Ist), 3.34-3.72 (H, m, C₄H Ist, C₂H Hip, 1H de C₄H₂ Pro, diast. A y B), 3.72-3.82 (1H, m, 1H de C₄H₂ Pro, diast. B), 3.99-4.40 (1H, m, 1H de C₄H₂ Pro, diast. A), 4.93-4.16 (1H, m, C₃H Ist), 4.49 (1H, d, J=10.5 Hz, NH Ist, diast. B), 4.54-4.59 (1H, m, C₆H Pro, diast. B), 4.63-4.70 (2H, m, C₆H Leu del diast. B, C₆H Pro del diast. A), 4.75 (1H, d, J=4.5 Hz, C₄H Hip, diast. A), 4.77-4.81 (1H, m, C₆H Leu, diast. A), 4.95-5.19 (2H, m, benc.), 5.22 (1H, d, J=5 Hz, C₄H Hip, diast. B), 5.32 (1H, d, J=10.5 Hz, NH Ist, diast. A), 6.38 (1H, d, J=11 Hz, NH Ist, diast. A), 6.71 (1H, d, J=7.5

Hz. NH Leu, diast. A), 6.76 (1H, d, J=8.5 Hz, NH Leu, diast. B), 8.60 (1H, d, J=9.5 Hz, NH Leu, diast. A); ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ -5.05 y -4.49 (2 CH₃, Me-Si), 11.83 y 12.03 (CH₃, Me-C₆ Ist), 13.01 y 13.51 (CH₃, Me-C₅ Ist), 13.83 y 14.08 (CH₃, Me-C₂ Hip), 16.92 y 17.10 (CH₃, Me-C₅ Hip), 17.85 (C, tBu-Si), 19.14 y 19.65 (CH₃, Me-C₅ Hip) 21.57 y 22.09 (CH₃, Me Leu), 22.96 y 23.28 (CH₃, Me Leu), 24.36 y 24.60 (CH, C₉ Leu), 24.85 (CH₂, C₉ Pro), 25.73 (3 CH₃, tBu-Si), 26.97 y 27.33 (CH₂, C₆ Ist), 28.35 y 28.46 (3 CH₃, tBu), 28.93 y 29.09 (CH, C₅ Hip), 29.65 (CH₂, C₆ Pro), 34.12 y 34.16 (CH, C₅ Ist), 40.45 (CH₂, C₂ Ist, 1 diast.), 40.85 y 41.18 (CH₂, C₆ Leu), 42.20 (CH₂, C₂ Ist, 1 diast.), 46.74 y 46.16 (CH₂, C₄ Pro), 47.99 (CH, C₂ Hip, 1 diast.), 48.34 y 48.90 (CH, C₆ Leu); 49.42 (CH, C₂ Hip, 1 diast.), 57.62 (CH, C₄ Ist, 1 diast.), 58.81 y 58.96 (CH, C₆ Pro), 60.46 (CH, C₄ Ist, 1 diast.), 66.62 y 66.88 (CH₂, benc.), 68.18 y 69.69 (CH, C₃ Ist), 78.98 (CH, C₄ Hip, 1 diast.), 79.24 y 79.84 (C, tBu), 82.95 (CH, C₄ Hip, 1 diast.), 128.08-128.49 (CH, CAr), 135.48 y 135.61 (C, CAr), 155.85 y 158.27 (CO, BOC), 157.44 (CO, Bzl), 168.40 y 169.07 (CO, ester), 170.65 y 170.86 (CO), 171.42 y 171.79 (CO), 203.09 y 205.97 (CO); *m/z* (FAB) 846.6 [(M+H)⁺, 5 %], 746.6 [(M-C₅H₉O₂+H)⁺, 72 %]; HPLC tr 26 y 25 min en una columna nucleosil C18 (φ=10 m) (fase reversa) haciendo un gradiente lineal de 10% B hasta 100% B en 20 min seguido de 10 min de elución isocrática al 100% B. (A: H₂O+0.045% TFA, B: MeCN+0.036% TFA), flujo= 1ml/min, detección= 220 nm.

H-Ist-Hip-Leu-Pro-OBzl.HCl

Boc-Ist(TBDMS)-Hip-Leu-Pro-OBzl (141.2 mg, 0.167 mmol) se disolvió en dioxano (1 ml), se le añadió una solución de HCl en dioxano (5.7 N) a temperatura ambiente. A las 3 h 30 min se eliminó el disolvente a presión reducida. Después de varias coevaporaciones con CH₂Cl₂ y éter se obtuvo H-Ist-Hip-Leu-Pro-OBzl.HCl (105 mg, 99%) en forma de un sólido blanco que se utilizó en la siguiente etapa sin purificar. HPLC tr 153 y 15.7 min en una columna nucleosil C18 (φ= 10 m) (fase reversa) haciendo un gradiente lineal de 10% B hasta 100% B en 20 min seguido de 10 min de elución isocrática al 100% B. (A: H₂O+0.045% TFA, B: MeCN+0.036% TFA), flujo= 1 ml/min, detección=220 nm; *m/z* (FAB) 632.6 (M⁺, 100%).

Boc-Thr[Z-N(Me)-O(Me)-Tyr]Ist-Hip-Leu-Pro-OBzl

Boc-Thr[Z-N(Me)-O(Me)-Tyr]-OH (119 mg, 0.217 mmol), HBTU (83 mg, 0.217 mmol) y HOBt (30 mg, 0.217 mmol) se disolvieron en THF anhidro (1.2 ml) bajo atmósfera de N₂ a una temperatura de -15°C y seguidamente se le añadió DIEA (37 ml, 0.217 mmol). Después de 2 minutos se le añadió H-Ist-Hip-Leu-Pro-OBzl.HCl (0.167 mmol) disuelto en THF (2 ml) y se añadió gota a gota DIEA (57 ml, 0.334 mmol) en 15 minutos. La temperatura del sistema se mantuvo entre -10°C y -5°C durante 4 h 30 min. Se eliminó el disolvente, se volvió a disolver en AcOEt (30 ml) y se hicieron sucesivos lavados de la fase orgánica con soluciones de 5% KHSO₄, 5% NaHCO₃ y NaCl saturado. Después se secó con MgSO₄ y se eliminó el disolvente obteniéndose un crudo (329 mg) que se purificó por cromatografía sobre sílica (AcOEt-hexano, 1:1) aislándose la mezcla diastereoisomérica de Boc-Thr[Z-N(Me)-O(Me)-Tyr]Ist-Hip-Leu-Pro-OBzl (159 mg, 82%) en forma de un sólido blanco. Rf 0.29 y 0.1 (AcOEt-hexano, 1:1); IR (film, CH₂Cl₂) (max 3450-3260, 2961, 2927, 2893, 1744, 1688, 1638, 1514, 1454, 1368, 1304, 1248, 1171, 1067, 1036 cm⁻¹); ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 0.74-0.9 (18H, md, 2 Me-C₅ Hip, Me-C₅ Ist, Me-C₆ Ist, 2 Me Leu), 1.05-1.15 y 1.18-1.20 (2H, m, C₅H₂ Ist), 1.23 y 1.25 (3H, d, J=7 Hz y J=7 Hz, Me-C₆ Thr), 1.29 y 1.29 (3H, d, J=7 Hz y J=7 Hz, Me-C₂ Hip), 1.42 (9H, s, tBu, diast. A), 1.45 (9H, s, tBu, diast. B), 1.50-1.66 (3H, m, C₉H Leu, C₆H₂ Leu), 1.89-2.02 (4H, m, C₅H Ist, 1 H de C₆H₂ Pro, C₉H₂ Pro), 2.17-2.25 (2H, m, 1 H de C₆H₂ Pro, C₅H Hip), 2.37-2.42 (1H, m, C₂H₂ Ist), 2.81 y 2.88 (3H, Nme Tyr, isómeros rotacionales del diast. A), 2.91 y 2.95 (3H, Nme Tyr, isómeros rotacionales del diast. B), 2.84-2.93 (2H, m, 1 H de C₂H₂ Ist, 1 H de C₆H₂ Tyr), 3.17-3.25 (1H, m, 1 H de C₆H₂ Tyr), 3.53-3.59 (1H, m, C₄H₂ Pro), 3.75 (3H, s, OMe), 3.88-3.98 (4H, m, 1 H C₄H₂ Pro, C₃H Ist, C₂H Hip, C₄H Ist), 4.49 y 4.51 (1H, d, J=3 Hz y J=3 Hz, C₆H Thr), 4.53-4.57 (1H, m, C₆H Pro), 4.68-4.72 (1H, m, C₆H Leu), 4.96-4.99 (1H, m, C₆H Tyr), 5.02-5.33 (4H, m, 2 CH₂ benc.), 5.02 (1H, d, J=3 Hz, C₄H Hip, diast. A), 5.23 (1H, d, J=3 Hz, C₄H Hip, diast. B), 5.26-5.33 (1H, m, C₆H Thr), 5.47 (1H, d, J=9.5 Hz), 6.74 y 7.00 (4H, CArH Tyr *orto* y *meta* al OMe respectivamente, sistema AB, diastereoisómero B), 6.77 y 7.08 (4H, CArH Tyr *orto* y *meta* al OMe respectivamente, sistema AB, diastereoisómero A), 7.17 y 7.21 (1H, d, J=7.5 Hz y J=9.5 Hz, NH Ist), 7.23-7.36 (10H, m, CArH), 7.75 (1H, d, J=8 Hz, NH Leu, diast. A), 7.79 (1H, d, J=8 Hz, NH Leu, diast. B); ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 11.95 (CH₃, Me-C₆ Ist), 13.27 (CH₃, Me-C₅ Ist), 15.16 (CH₃, Me-C₂ Hip), 16.47 (CH₃, Me-C₅ Hip), 17.33 (CH₃, Me Thr), 18.79 (CH₃, Me-C₅ Hip), 21.28 (CH₃, Me Leu), 23.65 (CH₃, Me Leu), 24.65 (CH, C₉ Leu), 24.72 (CH₂, C₉ Pro), 27.09 (CH₂, C₆ Ist), 28.08 (3 CH₃, tBu), 28.93 (CH₂, C₆ Pro), 31.20 (CH, C₅ Hip), 31.32 (CH₃, Nme), 33.62 (CH, C₅ Ist), 33.98 (CH₂, C₆ Tyr), 38.38 (CH₂, C₂ Ist), 41.01 (CH₂, C₆ Leu), 47.12 (CH₂, C₄ Pro), 49.38 (2 CH, C₂ Hip, C₆ Leu), 54.96 (CH, C₄ Ist), 55.17 (CH₃, OMe), 57.89 (CH, C₆ Thr), 58.83 (CH, C₆ Pro), 60.01 y 60.16 (CH, C₆ Tyr), 67.18 (CH y CH₂, C₃ Ist, 2 CH₂ benc.), 71.05 y 71.32

(CH, C₆ Thr), 80.34 (C, tBU), 81.24 (CH, C₄ Hip), 113.89 (2 CH, CArH Tyr orto al OMe), 127.51-128.59 (10CH, CAr), 129.69 i 129.77 (2 CH, CArH Tyr meta al OMe), 135.52 y 136.77 (2 C, CAr), 156.93 (2 CO), 158.27 (CO), 169.87 (CO), 170.62 (CO), 171.15 (CO), 171.85 (CO), 172.39 (CO), 204.88 (CO); *m/z* (FAB), 1180 [(M+Na)⁺, 100%], 1158 [(M+H)⁺, 8%], 1058 [(M-C₅H₉O₂+H)⁺, 19%]; HPLC tr 21 y 22 min en una columna nucleosil C18 (φ = 10 m) (fase reversa) haciendo un gradiente lineal de 10% B hasta 100% B en 20 min seguido de 10 min de elución isocrática al 100% B, (A: H₂O+0.045% TFA, B: MeCN+0.036% TFA), flujo=1 ml/min, detección=220 nm.

Boc-Thr[H-N(Me)-O(Me)-Tyr]Ist-Hip-Leu-Pro-OH

10 Boc-Thr[Z-N(Me)-O(Me)-Tyr]Ist-Hip-Leu-Pro-OBzl (45 mg, 39.12 mmol) se añadió a una suspensión de 10% Pd-C (39 mg, 86% en peso) en THF (1.7 ml) bajo atmósfera de N₂, se cambió el N₂ por H₂ y se purgó el sistema. El sistema se mantuvo 2 h 45 min con fuerte agitación magnética. Después se filtró sobre celite lavando varias veces con THF. Se eliminó el disolvente y se obtuvo BOC-Thr[H-N(Me)-O(Me)-Tyr]Ist-Hip-Leu-Pro-OH (37 mg, 99%) en forma de aceite. ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 0.79-1.08 (18H, md, 2 Me Leu, 2 Me Ist, 2 Me-C₅ Hip), 1.80-1.38 (3H, m, C₆H₂ Ist, C₅H Ist), 1.26 (3H, sa, Me Thr), 1.29 (3H, d, J=7 Hz, Me-C₂ Hip), 1.50-1.66 (3H, m, C₆H₂ Leu, C₉H Leu), 1.84-1.94 (1H, m, C₅H Ist), 1.90-2.28 y 2.35-2.50 (4H, 2m, C₆H₂ Pro, C₉H₂ Pro), 2.30-2.35 (1H, m, C₅H Hip), 2.44-3.18 (4H, nm, C₆H₂ Ist, C₆H₂ Tyr), 2.60 (3H, NMe, Tyr), 3.53-3.61 (1H, m, 1H de C₄H₂ Pro), 3.77 (3H, OMe), 3.88-4.07 (4H, 4m, 1H de C₄H₂ Pro, C₃H Ist, C₂H Hip, C₄H Ist), 4.12-4.72 (4H, 4m, C₆H Thr, C₆H Pro, C₆H Leu, C₆H Tyr), 5.18-5.24 (1H, m, C₆H Thr), 5.24 (1H, sa, C₄H Hip), 6.84 (2H, d, J=8 Hz, CArH Tyr orto al OMe), 7.08 (2H, d, J=8 Hz, CArH Tyr meta al OMe), 7.13 y 7.18 (1H, 2d, J=8 Hz, NH Thr, 2 diast.), 7.62-7.68 (1H, NH Leu); *m/z* (FAB) 972.7 [(M+K)⁺, 33%], 934.9 [(M)⁺, 88%]. HPLC tr 14.7, 15.2 min en una columna nucleosil C18 (φ = 10 m) (fase reversa) haciendo un gradiente lineal de 10% B hasta 100% B en 20 min seguido de 10 min de elución isocrática al 100% B, (A: H₂O+0.045% TFA, B: MeCN+0.036% TFA), flujo= 1 ml/min, detección= 220 nm.

Ciclo-BOC-Thr[N(Me)-O(Me)-Tyr]Ist-Hip-Leu-Pro

30 Boc-Thr[H-N(Me)-O(Me)-Tyr]Ist-Hip-Leu-OH (36 mg, 39.12 mmol) se disolvió en THF (34 ml) y a 0°C se le añadió HATU (18.2 mg, 46.94 mmol), HOAt (6.5 mg, 47.73 mmol) y DIEA (13.3 ml, 78.24 mmol). Se dejó que el sistema llegara a temperatura ambiente y a las 17 h de reacción se eliminó el disolvente. Se volvió a disolver en AcOEt (10 ml) y se hicieron sucesivos lavados con soluciones de 5% KHSO₄, 5% NaHCO₃ y NaCl saturado; se secó con MgSO₄ y se eliminó el disolvente obteniéndose un crudo (49 mg) que se purificó por cromatografía sobre sílica (AcOEt-hexano, 1:1), aislando ciclo-Boc-Thr[N(Me)-O(Me)-Tyr]Ist-(4S)-Hip-Leu (27 mg, 76%) en forma de aceite que posteriormente solidificó. P f 164-168°C; [α]_D -209.4 (c 0.32, CHCl₃); Rf 0.21 (AcOEt-hexano, 1:1); IR (film, CH₂Cl₂) (max 3343 (ancho), 2961, 2927, 2893, 1734, 1640, 1514, 1454, 1368, 1302, 1248, 1167, 1018 cm⁻¹; ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) 0.8 (3H, d, J=7 Hz, Me-C₅ Hip), 0.85 (3H, d, J=7 Hz, Me-C₅ Hip), 0.87 (3H, d, J=7 Hz, Me-C₅ Ist), 0.89-0.93 (9H, md, 2 Me Leu, Me-C₆ Ist), 1.10-1.20 (1H, m, C₅H Ist), 1.20 (3H, d, J=6 Hz, me Thr), 1.30 (3H, d, J=7 Hz, Me-C₂ Hip), 1.36-1.44 (2H, m, C₆H₂ Ist), 1.44 (9H, s, tBU), 1.48-1.72 (2H, m, C₆H₂ Leu), 1.72-1.78 (1H, m, C₆H₂ Pro), 1.83-1.88 (1H, m, C₉H Leu), 2.01-2.17 (3H, 2m, 1 H de C₆H₂ Pro, C₉H₂ Pro), 2.27-2.29 (1H, m, C₅H Hip), 2.47-2.53 (1H, m, C₂H₂ Ist), 2.53 (3H, s, NMe), 2.93 (1H, sa, OH), 3.14-3.19 (2H, m, C₂H₂ Ist, 1H C₆H₂ Tyr), 3.34-3.37 (1H, dd, J=15 Hz, J=4 Hz, 1H C₆H₂ Tyr), 3.54-3.56 (1H, dd, J=10.5 Hz, J=4 Hz, C₆H Tyr), 3.58-3.63 (1H, m, 1 H C₄H₂ Pro), 3.68-3.72 (1H, m, 1 H C₄H₂ Pro), 3.78 (3H, s, OMe), 3.94-3.98 (1H, m, C₃H Ist), 3.98 (1H, q, J=7.5 Hz, C₂H Hip), 4.07-4.11 (1H, 3d, J=4 Hz, C₄H Ist), 4.57-4.61 (2H, m, C₆H Thr, C₆H Pro), 4.77-4.81 (1H, m, C₆H Leu), 4.97-4.98 (1H, qa, J=3.5 Hz, C₆H Thr), 5.02 (1H, d, J=10.5 Hz), 5.18 (1H, d, J=4Hz, C₄H Hip), 6.81 (2H, d, J=8.5 Hz, CArH Tyr orto al OMe), 7.05 (2H, d, J=8.5 Hz, CArH Tyr meta al OMe), 7.19 (1H, d, J=10 Hz, NH Ist), 7.64 (1H, d, J=10 Hz, NH Leu); ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 11.56 (CH₃, Me-C₅ Ist), 14.68 (CH₃, Me-C₅ Hip), 14.97 (CH₃, Me Thr), 15.27 (CH₃, Me-C₂ Hip), 16.61 (CH₃, Me-C₅ Hip), 18.45 (CH₃, Me-C₅ Hip), 20.64 (CH₃, Me Leu), 23.50 (CH₃, Me Leu), 24.71 (CH, C₉ Leu), 24.78 (CH₂, C₉ Pro), 26.92 (CH₂, C₆ Pro), 27.73 (CH₂, C₆ Ist), 27.94 (3 CH₃, tBU), 31.55 (CH, C₅ Hip), 33.94 (CH₂, C₆ Tyr), 33.94 (CH, C₅ Ist), 38.27 (CH₂, C₂ Ist), 38.52 (CH₃, NMe Tyr), 40.64 (CH₂, C₆ Leu), 46.86 (CH₂, C₆ Pro), 49.54 (CH, C₂ Hip), 49.65 (CH, C₆ Leu), 55.16 (CH₃, OMe), 55.19 (CH, C₄ Ist), 55.84 (CH, C₆ Thr), 57.12 (CH, C₆ Pro), 65.96 (CH, C₆ Tyr), 67.30 (CH, C₃ Ist), 71.00 (CH, C₆ Tyr), 80.27 (C, tBU), 81.41 (CH, C₄ Hip), 114.02 (2 CH, CArH Tyr orto al OMe), 130.22 (2 CH, CArH Tyr meta al OMe), 158.53 (2 C, CAr Tyr), 168.30 (CO), 169.31 (CO), 170.12 (CO), 170.29 (CO), 171.20 (CO), 172.38 (CO), 204.51 (CO); *m/z* (FAB) 938.6 [(M+Na)⁺, 12%], 916.2 [(M+H)⁺, 31%], 816.8 [(M-C₅H₉O₂+H)⁺, 68%]; HPLC tr 20.4 min en una columna nucleosil C18 (φ = 10 m) (fase reversa) haciendo un gradiente lineal de 10% B hasta 100% B en 20 min seguido de 10 min de elución isocrática al 100% B, (A: H₂O+0.045% TFA, B: MeCN+0.036% TFA), flujo= 1 ml/min, detección= 220 nm.

Ciclo-H-Thr[N(Me)-O(Me)-Tyr]Ist-Hip-Leu Pro. HCl

El macrociclo ciclo-BOC-Thr(N(Me)-O(Me)-Tyr)Ist-Hip-Leu-Pro (9 mg, 9.93 mmol) se disolvió en dioxano (50 ml), y posteriormente se trató con 5.7 N HCl-dioxano (700 ml) a temperatura ambiente. Después de 1 h se eliminó el disolvente a presión reducida y se hicieron coevaporaciones con CH₂Cl₂ y éter anhidro. Se obtuvo ciclo-H-Thr[N(Me)-O(Me)-Tyr]Ist-Hip-Leu. HCl (8.5 mg, 99%). HPLC tr 15.0 min en una columna nucleosil C18 (ϕ = 10 m) (fase reversa) haciendo un gradiente lineal de 10 % B hasta 100 % B en 20 min seguido de 10 min de elución isocrática al 100 % B. (A: H₂O+ 0.045 % TFA. B: MeCN+ 0.036 % TFA). flujo= 1 ml/min, detección= 220 nm, m/z (FAB) 8.38.3 [(M+Na)⁺, 28 %], 8.16.3 [(M+H)⁺, 100 %], 7.98.3 [(M-H₂O+H)⁺, 36 %].

BOC-didemnina A

En un microreactor se disolvieron Boc-(R)-N(Me)-Leu-OH (6 mg, 24.82 mmol), BOP (12 mg, 27.31 mmol) y HOBt (4 mg, 27.31 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (65 ml) a 0°C y se añadió DIEA (4.2 ml, 24.82 mmol). A continuación se añadió ciclo-H-Thr[N(Me)-O(Me)-Tyr]Ist-Hip-Leu-Pro. HCl (9 mg, 9.93 mmol) disuelto en CH₂Cl₂ anh. (120 ml) y se dejó que el sistema llegara a temperatura ambiente. Después de 40 minutos se evaporó el CH₂Cl₂ y el residuo se volvió a disolver en AcOEt (5 ml), se hicieron sucesivos lavados con 5 % KHSO₄, 5 % NaHSO₄ y NaCl saturado, se secó con MgSO₄ y se eliminó el disolvente. Se obtuvo un crudo (19 mg) que se purificó por cromatografía líquida sobre sílica (AcOEt-hexano, 1:1) y se aisló Boc-didemnina A (9.5 Mg, 92 %) en forma de aceite que posteriormente solidificó. p f 121-124°C; Rf 0.16 (AcOEt-hexano, 1:1); $[\alpha]_D$ -84.19 (c 0.37, CHCl₃); IR (film, CH₂Cl₂) (max 3338 (ancho), 2959, 2930, 2875, 1734, 1667, 1640, 1539, 1514, 1454, 1389, 1368, 1321, 1248, 1157, 1076 cm⁻¹); ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) d 0.82-0.92 (24H, md, 2 Me Hip, 2 Me Ist, 2 Me Leu, 2 Me MeLeu), 1.11-1.19 (1H, m, C₆H₂ Ist), 1.22 (3H, d, J=6 Hz, Me Thr), 1.32 (3H, d, J=6.5 Hz, Me-C₂ Hip), 1.30-1.35 (1H, m, C₆H₂ Ist), 1.35-1.63 (6H, m, C₆H₂ Leu, C₆H₂ MeLeu, C₉H Leu, C₉H MeLeu), 1.71-1.81 (2H, m, C₅H Ist, 1 H de C₆H₂ Pro), 1.93-2.07 (1H, m, C₆H₂ Pro), 2.07-2.18 (2H, m, C₉H₂ Pro), 2.28-2.34 (1H, m, C₅H Hip), 2.49-2.52 (1H, dd, J=10.5 Hz, J=11 Hz, 1 H de C₂H₂ Ist), 2.54 (3H, s, NMe Tyr), 2.72 y 2.79 (3H, sa, NMe MeLeu, isómeros rotacionales), 2.86-2.94 (1H, sa, OH), 2.72-2.79 (1H, da, J=10.5 Hz, 1 H de C₂H₂ Ist), 3.15-3.18 (1H, dd, J=14.5 Hz, J=10.5 Hz, 1H de C₆H₂ Tyr), 3.33-3.36 (1H, dd, J=14.5 Hz, J=4.5 Hz, 1H de C₆H₂ Tyr), 3.54-3.57 (1H, dd, J=10.5 Hz, J=4.5 Hz, C₆H Tyr), 3.56-3.61 (1H, m, 1 H de C₆H₂ Pro), 3.78 (3H, s, OMe), 3.96-4.00 (1H, m, C₃H Ist), 4.03-4.08 (1H, m, C₄H Ist), 4.11-4.80 (1H, sa, C₂H Hip), 4.56-4.62 (1H, m, C₆H Pro), 4.68-4.81 (3H, m, C₆H Thr, C₆H MeLeu, C₆H Leu), 4.99-5.01 (1H, qa, J=3.5 Hz, C₆H Thr), 5.16 (1H, sa, C₄H Hip), 6.83 (2H, d, J=8.5 Hz, C_{Ar}H Tyr *orto* al OMe), 6.95 (1H, sa, NH Thr), 7.07 (2H, d, J=8.5 Hz, C_{Ar}H Tyr *meta* al OMe), 7.2-7.25 (1H, sa, NH Ist), 7.95 (1H, sa, NH Leu); ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) d 11.55 (CH₃, Me-C₆ Ist), 14.95 (CH₃, Me-C₅ Ist), 15.26 (2 CH₃, Me Thr, Me-C₂ Hip), 16.82 (CH₃, Me-C₅ Hip), 18.56 (CH₃, Me-C₅ Hip), 20.89 (CH₃, me Leu), 22.00 (CH₃, Me Leu), 23.08 (CH₃, Me MeLeu), 23.76 (CH₃, Me MeLeu), 24.58 (CH, C₉H Leu), 24.85 (CH, C₉H MeLeu), 25.10 (CH₂, C₉ Pro), 27.12 (CH₂, C₆ Pro), 29.35 (3 CH₃, tBu), 29.35 (CH₂, C₆ Ist), 29.65 y 29.69 (CH₃, NMe MeLeu, isómeros rotacionales), 31.36 (CH C₅ Hip), 33.96 (CH₂, C₆ Tyr), 34.14 (CH, C₅ Ist), 38.51 (CH₂, C₂ Ist), 38.64 (CH₃, NMe Tyr), 40.14 (2 CH₂, C₆ Leu, C₆ MeLeu), 55.38 (CH, C₆ Thr), 55.56 (CH, C₄ Ist), 57.31 (CH, C₆ Pro), 66.17 (CH, C₆ Tyr), 67.85 (CH, C₃ Ist), 70.58 (CH, C₆ Thr), 80.96 y 80.98 (C, tBu, isómeros rotacionales), 81.57 (CH, C₄ Hip), 114.12 (2 CH, C_{Ar}H Tyr *orto* al OMe), 130.33 (2 CH, C_{Ar}H Tyr *meta* al OMe), 158.63 (CO), 168.41 (CO), 169.33 (CO), 169.70 (CO), 170.38 (CO), 171.24 (CO), 172.28 (CO), 172.28 (CO), 172.93 (CO), 204.83 (CO); m/z (FAB) 1065.8 [(M+Na)⁺, 31 %], 1043.8 [(M+H)⁺, 100 %], 943.7 [(M-C₅H₈O₂+H)⁺, 84 %]; HPLC tr 21.2 min en una columna nucleosil C18 (ϕ = 10 m) (fase reversa) haciendo un gradiente lineal de 10 % B hasta 100 % B en 20 min seguido de 10 min de elución isocrática al 100 % B. (A: H₂O+0.045 % TFA. B: MeCN+0.036 % TFA). flujo= 1 ml/min, detección=220 nm.

Didemnina A.HCl.

Boc-didemnina A (4 mg, 3.88 mmol) se disolvió en dioxano (50 ml) y posteriormente se trató con 6N HCl en dioxano durante 30 minutos. Se eliminó el disolvente a presión reducida y se hicieron varias coevaporaciones con CH₂Cl₂ y después con éter anhidro hasta obtener didemnina A.HCl como un sólido blanco (3.9 mg, 99 %). HPLC tr 17.4 min en una columna nucleosil C18 (ϕ = 10 m) (fase reversa) haciendo un gradiente lineal de 10 % B hasta 100 % B en 20 min seguido de 10 min de elución isocrática al 100 % B. (A: H₂O+0.045 % TFA. B: MeCN+0.036 % TFA). flujo= 1 ml/min, detección= 220 nm, m/z (ES) 9:44 (M⁺, 100 %).

Pir-Pro-OBzl

Pro-OBzl.HCl (6.26 g, 0.0259 mmol) se disolvió en CH_2Cl_2 (14 ml), se enfrió a 0°C y se le añadió DIEA (4.4 ml, 0.0259 mmol). Después de 5 minutos, a 0°C se añadió ácido pirúvico (1.58 ml, 0.0216 mmol), DCC (5.35 g, 0.0259 mmol), HOBt (3.27 g, 0.0238 mmol) y DIEA (3.67 ml, 0.0216 mmol). Después de 32 horas a temperatura ambiente, el crudo se filtró en frío y se eliminó el disolvente. El residuo se volvió a disolver en AcOEt, se lavó con soluciones de 5% KHSO_4 , 5% NaHCO_3 y NaCl saturado, se secó con MgSO_4 y se eliminó el disolvente. Se obtuvo un crudo que se purificó por cromatografía sobre sílica (AcOEt-hexano, 3:7) aislandose Pir-Pro-OBzl (2.04 g, 36%). Rf 0.32 (AcOEt-hexano, 3:7); $[\alpha]_D -66.8^\circ$ (c 0.144, CHCl_3); IR (film, CH_2Cl_2) (max 3035, 2956, 2884, 1744, 1717, 1645, 1499, 1443, 1383, 1352, 1273, 1175, 1092 cm^{-1}); ^1H -RMN (200 MHz, CDCl_3) δ 1.75-2.40 (4H, m, C_6H_2 Pro, C_9H_2 Pro), 2.37 y 3.44 (3H, s, Me Pir, isómeros rotacionales), 3.45-3.82 (2H, C_dH_2 Pro), 4.52-4.61 y 4.88-4.97 (1H, dd, C_dH Pro, isómeros rotacionales), 5.14-5.15 y 5.17-5.20 (2H, dd, *benc.* isómeros rotacionales), 7.34 y 7.36 (5H, ar, isómeros rotacionales); ^{13}C -RMN (50 MHz, CDCl_3) δ 22.11 y 25.22 (CH_2 , C_9 Pro), 26.5 y 27.10 (CH_3 , Me Pir), 28.53 y 31.48 (CH_2 , C_b Pro), 47.53 y 44.81 (CH_2 , C_d Pro), 59.76 (CH , C_a Pro), 67.02 y 67.31 (CH_2 , *benc.*) 128.11-128.64 (5CH, CAr), 135.24 (C, CAr), 170.1 y 170.2 (CO), 198 (CO); m/z 298 [(M+Na) $^+$, 19%], 276 [(M+H) $^+$, 100%].

Pir-Pro-OH

Pir-Pro-OBzl (174 mg, 0.632 mmol) se disolvió en THF (2 ml) y se añadió a una suspensión de 10% Pd-C (50% H_2O) (105 mg, 60% en peso) en THF (2 ml) bajo N_2 . Se cambió la atmósfera inerte por H_2 y se purgó el sistema. Después de 3 h a temperatura ambiente, se filtró sobre celite y se eliminó el disolvente, obteniéndose un crudo (120 mg) que se purificó por cromatografía sobre sílica (AcOEt-hexano, 6:4) aislandose Pir-Pro-OH (85 mg, 72%) en forma de sólido blanco; $[\alpha]_D -112^\circ$ (c 0.12, CHCl_3); IR (film, CH_2Cl_2) (max 3450-3000, 2961-2870, 1719, 1643, 1615, 1452, 1354, 1205, 1175, 1094, 1018 cm^{-1}); ^1H -RMN (200 MHz, CDCl_3) δ 1.85-2.45 (4H, M, C_6H_2 Pro, C_9H_2 Pro), 2.43 y 2.47 (3H, s, Me Pir), 3.42-3.85 (2H, m, C_dH_2 Pro), 4.52-4.61 y 4.88-4.97 (1H, dd, C_dH Pro), 7.21-7.40 (1H, sa, COOH); ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) δ 22.031 y 25.23 (CH_2 , C_9 Pro), 26.48 y 27.00 (CH_3 , Pir), 28.23 y 31.44 (CH_2 , C_b Pro), 47.57 y 48.37 (CH_2 , C_d Pro), 59.61 y 59.395 (CH , C_a Pro), 162.47 y 162.52 (CO), 175.04 y 176.29 (CO), 197.18 (CO); m/z (IQ) 220 [(M+Cl) $^-$, 7%], 203 [(M+NH $_4$) $^+$, 100%], 186 [(M+H) $^+$, 16%].

Dehidrodidemnina B

En un microreactor se introdujo didemnina A. HCl (8 mg, 8.53 mmol), el sistema se enfrió a -5°C y bajo atmósfera inerte se le añadió: Pir-Pro-OH (6 mg, 34.7 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (35 ml), PyBroP (16 mg, 34.7 mmol) en CH_2Cl_2 (40 ml), DIEA (8.7 ml, 51.2 mmol). La temperatura del sistema se dejó subir lentamente hasta temperatura ambiente y después de 4 horas se eliminó el CH_2Cl_2 . Se volvió a disolver en AcOEt (10 ml) y se lavó con soluciones de 5% KHSO_4 , 5% NaHCO_3 y NaCl saturado, se secó con MgSO_4 y se eliminó el disolvente. El crudo (20 mg) que se obtuvo se purificó por cromatografía sobre sílica (AcOEt: CH_2Cl_2 , 1:1) y se aisló dehidrodidemnina B (6 mg, 62%) en forma de aceite que posteriormente solidificó. p f 141-145 $^\circ\text{C}$; Rf 0.40 y 0.28 (CH_2Cl_2 :AcOEt, 2:3), 0.52 y 0.45 (CHCl_3 :MeOH, 9.5:0.5); ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 0.84-0.93 (24H, md, 2 Me MeLeu, 2 Me Leu, 2 Me Hip, 2 me Ist), 1.16-1.70 (9H, mm, C_6H_2 Ist, C_6H_2 Leu, C_9H_2 Leu, C_6H_2 MeLeu, C_5H Ist, C_9H MeLeu), 1.72-1.81 (10H, m, 1H de $\text{C}_6\text{H}_2\text{Pro}^2$), 1.81-1.90 (1H, m, $\text{C}_6\text{H}_2\text{Pro}$), 1.90-2.24 (6H, mm, 1H de $\text{C}_6\text{H}_2\text{Pro}$, $\text{C}_9\text{H}_2\text{Pro}$, $\text{C}_9\text{H}_2\text{Pro}^2$, 1H de $\text{C}_6\text{H}_2\text{Pro}^2$), 2.30-2.39 (1H, m, C_5H Hip), 2.49 y 2.51 (3H, Me Pir, isómeros conformacionales), 2.55 (3H, Nme Tyr), 2.52-2.64 (1H, m, 1H de C_2H_2 Ist), 2.85 y 2.94 (1H, sa, OH, isómeros conf.), 3.09 y 3.13 (3H, s, NMe MeLeu, isómeros conf.), 3.15-3.18 (1H, m, 1H de C_6H_2 Tyr), 3.21-3.26 (1H, dd, J=16 Hz, J=6 Hz, 1H C_2H_2 Ist), 3.32-3.36 (1H, dd, J=14.5 Hz, J=4 Hz, 1H de C_6H_2 Tyr), 3.54-3.60 (1H, m, 1H de C_dH_2 Pro), 3.66-3.72 (1H, m, 1H de C_dH_2 Pro), 3.78 (3H, s, OMe), 3.80-3.87 (1H, m, 1H de C_dH_2 Pro 2), 3.96-3.99 (1H, m, 1H de C_dH_2 Pro 2), 4.03-4.11 (2H, M, C_4H Ist, C_3H Ist), 4.15-4.23 (1H, 2q, J=7.5 Hz, C_2H Hip, isómeros conf.), 4.55-4.57 (1H, 2d, J=5.5 Hz, J=2 Hz, C(H) Thr, 1 conformer), 4.59-4.62 (1H, ta, C_aH Pro), 4.56-4.64 (1H, dd, J=6.5 Hz, J=2.5 Hz, C_aH Thr 1 conformer), 4.68-4.71 (1H, ta, C_aH Pro 2), 4.76-4.81 (1H, ta, C_aH Leu 2 conformers), 5.10-5.18 (1H, m, C_6H Thr 1 conformer), 5.17 y 5.18 (1H, d, J=3.5 Hz, C_4H Hip 2 conformers), 5.27-5.31 (2H, m, C_6H Thr 1 conformer, C_aH MeLeu 1 conformer), 6.82 y 6.83 (2H, d, J=8.5 Hz, CArH Tyr *orto* al OMe, 2 conformers), 7.05 y 7.06 (2H, d, J=8.5 Hz, CArH Tyr *meta* al OMe, 2 conformers), 7.02 (1H, d, J=7 Hz, NH Thr 1 conformer), 7.16 y 7.17 (1H, d, J=9.5 Hz, NH Ist, 2 conformers), 7.59 (1H, d, J=5.5 Hz, NH Thr 1 conformer) 7.77 (1H, d, J=9.5 Hz, NH Leu, 1 conformer), 7.83 (1H, d, J=9 Hz, NH Leu, 1 conformer); ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 11.63 y 11.68 (CH_3 , Me- C_6 Ist), 14.11 y 14.70 (CH_3 , Me- C_5 Ist), 15.26 y 15.30 (CH_3 , Me- C_2 Hip), 16.00 y 16.20 (CH_3 , Me Thr), 16.88 y 16.93 (CH_3 , Me- C_5 Hip), 18.62 y 18.85 (CH_3 , Me- C_5 Hip), 20.89

ES 2 102 322 A1

y 20.94 (CH₃, Me MeLeu), 21.62 y 21.36 (CH₃, Me MeLeu), 23.44 y 23.57 (CH₃, Me Leu), 23.84 y 23.93 (CH₃, Me Leu), 24.66 y 24.77 (CH, C₉ Leu), 24.85 y 25.02 (CH₂, C₉ Pro) 26.22 y 26.34 (CH₂, C₉ Pro²), 27.09 y 27.6 (CH₃, Pir), 27.06 y 27.30 (CH, C₉ MeLeu), 27.95 y 27.99 (CH₂, C₆ Pro C₆ Pro²), 29.33 y 29.69 (CH₂, C₅ Ist), 31.31-31.37 (CH₃, CH, NMe MeLeu, C₅ Hip), 33.97-34.06 (CH₂ CH, C₆ Tyr, C₅ Ist), 36.02 y 36.45 (CH₂, C₆ MeLeu), 38.68-38.76 (CH₂, CH₃, C₂ Ist, NMe Tyr), 41.01-41.15 (CH₂, C₆ Leu), 47.00 (CH₂, C₄ Pro), 48.42 y 48.48 (CH₂, Cd Pro²), 48.86 (CH, C₆ Tyr), 49.20-49.51 (2 CH, C₆ Hip, C₆ Leu), 54.65 y 54.75 (CH, C₆ MeLeu), 55.26 (CH₃ OMe), 55.58 y 55.61 (CH, C₄ Ist), 57.14 y 57.27 (2 CH, C₆ Pro, C₆H Pro²), 57.47 y 57.79 (CH, C₆ Thr), 66.24 y 33.39 (CH, C₆ Tyr), 67.80 y 67.99 (CH, C₃ Ist), 70.34 y 70.67 (CH, C₆ Thr), 81.0 y 81.52 (CH, C₄ Hip), 114.10 (2 CH, CArH Tyr orto al OMe), 130.31 (2 CH, CArH Tyr meta al OMe), 156.0 (2 C, CAr Tyr), 158.65 (CO), 161.1 y 161.60 (CO), 168.20 (CO), 169.53 y 169.59 (CO), 170.452 (CO), 171.25 (CO), 171.80 (CO), 171.95 (CO), 172.26 y 172.33 (CO), 197.5 (CO), 204.80 y 204.85 (CO); m/z (FAB) 1132.6 [(M+Na)⁺, 42%], 1110.8 [(M+H)⁺, 100%]; HPLC: tr 19.0 y 19.8 min en una columna nucleosil C18 (φ= 10 m) (fase reversa) haciendo un gradiente lineal de 10% B hasta 100% B en 20 min seguido de 10 min de elución isocrática al 100% B, (A: H₂O+0.045% TFA, B: MeCN+0.036% TFA), flujo= 1 ml/min, detección= 220 nm.

20

25

30

35

40

45

50

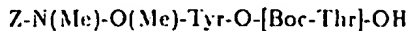
55

60

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de preparación de didemnina A, caracterizado porque comprende:

a) someter a acoplamiento las unidades

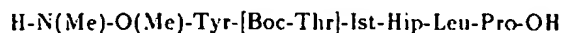


y



en presencia de HBTU y DIEA, para producir Z-N(Me)-O(Me)-Tyr-[Boc-Thr]-Ist-Hip-Leu-Pro-OBzl;

b) desproteger simultáneamente los extremos N- y C- terminal del producto de la etapa anterior mediante hidrogenólisis, para producir:



c) ciclar el producto de la etapa anterior utilizando el acoplante HBTU en presencia de HOBT y DIEA, para producir el correspondiente producto macrocíclico con el N-terminal de la Thr protegido;

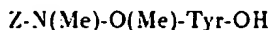
d) desproteger el grupo amino de la Thr por tratamiento con ácido trifluoracético y acoplar el macrólido obtenido con



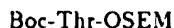
para producir la Boc-didemnina A;

e) someter la Boc-didemnina A obtenida en la etapa anterior a reacción con ácido trifluoracético, para producir la didemnina A.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la unidad Z-N(Me)-O(Me)-Tyr-O-[Boc-Thr]-OH se sintetiza a partir de



y

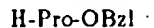


que se acoplan por esterificación en presencia de DCC para obtener un didepsipéptido, el cual se trata con ácido fluorhídrico acuoso para producir la mencionada unidad.

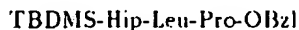
3. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la unidad H-Ist-Hip-Leu-Pro-OBzl.HCl se sintetiza a partir de



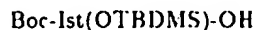
y



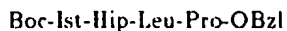
que se acoplan con DCC y HOBT para producir Boc-Leu-Pro-OBzl, que tras desprotección con ácido trifluoracético y acoplamiento con TBDMS-Hip-OH en presencia de HBTU, HOBT y DIEA proporciona



el cual por tratamiento con fluoruro de tetrabutilamonio y posterior esterificación con



en presencia de DCC, produce



que finalmente por tratamiento con clorhídrico en dioxano da lugar a la unidad deseada.



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

⑪ ES 2 102 322

⑫ N.º solicitud: 9501411

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 13.07.95

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.º: C07K 11/00

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO-9300362-A (BASF A.G.) 17.06.92	
A	WO-9104985-A (PHARMA MAR S.A.) 18.04.91	

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe 30.05.97	Examinador M. Novoa Sanjurjo	Página 1/1
--	---------------------------------	---------------

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.